



Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Biología ~ Instituto de Acuicultura
Universidad de Santiago de Compostela

Caracterización de un nuevo sistema de
asimilación de hierro mediante sideróforos en
Vibrio anguillarum

Memoria que presenta
Miguel Balado Dacosta
para optar al Grado de Doctor en Biología

Santiago de Compostela 2009

Manuel L. Lemos Ramos, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, y

Carlos Rodríguez Osorio, Investigador Contratado del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN: Que la presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*” que presenta **D. Miguel Balado Dacosta** para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, de la Universidad de Santiago de Compostela, y considerando que se halla concluida autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela a 19 de mayo de 2009.

Fdo.: Dr. Manuel L. Lemos Ramos

Fdo.: Dr. Carlos Rodríguez Osorio

El doctorando,

Fdo.: Miguel Balado Dacosta

El trabajo descrito en la presente memoria ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología con los proyectos AGL2003-00086 y AGL2006-0697.

Durante su realización se ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Resumen

En *Vibrio anguillarum*, el principal agente etiológico de la vibriosis en peces marinos, se han descrito dos sistemas de asimilación de hierro mediante sideróforos que desempeñan un papel importante en el proceso infeccioso. Uno de ellos, presente en gran parte de las cepas del serotipo O1, está codificado por plásmidos del tipo pJM1, mientras que el otro está codificado por genes cromosómicos y se ha descrito de forma preliminar en cepas de los serotipos O1 y O2 carentes de plásmidos. En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de este nuevo sistema. Se describe una región cromosómica que contiene 13 genes (denominados genes *vab*) que codifica la síntesis de un nuevo sideróforo de tipo catecol, la vancrobactina. Mediante la construcción de mutantes por delección de cada uno de estos genes, y su correspondiente complementación con el alelo salvaje, hemos demostrado que esta región cromosómica codifica la síntesis, regulación, transporte y utilización de la vancrobactina en la cepa RV22 del serotipo O2. El gen *vabG* codifica una DAHP sintetasa que proporciona el aumento de corismato necesario para que *vabABC* catalicen su conversión en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA), que es el grupo funcional de los sideróforos de tipo catecol. El gen *vabD* codifica la fosfopanteteinil transferasa que activa las péptido-sintetasas no ribosómicas codificadas por *vabE* y *vabF*. Éstas ensamblan finalmente la vancrobactina a partir de DHBA, arginina y serina. La naturaleza química del sideróforo ha sido confirmada mediante su aislamiento, purificación y análisis estructural, y se corresponde con la *N*-[*N'*-(2,3-dihidroxibenzoil)-D-arginil]-L-serina. El gen *vabS* codifica un posible exportador de membrana que participa en el proceso de secreción y *vabH* codifica una posible esterasa del ferri-sideróforo necesaria para la utilización del hierro captado con este sistema. El *cluster vab* codifica también dos receptores de membrana externa dependientes de TonB: FvtA, que interviene en el transporte del complejo hierro-vancrobactina, y ORF13, que parece no expresarse. La expresión de los genes *vab*, que se organiza en 6 unidades transcripcionales, es dependiente de la concentración de hierro, siendo el represor global Fur el principal regulador. Sin embargo, la regulación es un proceso complejo en el que la proteína VabR es necesaria para que la expresión de *vabG* alcance niveles máximos, siendo éste el único gen del sistema fuertemente reprimido por hierro sin la intervención de Fur. Además, se ha detectado la existencia de un mecanismo, dependiente de ferri-vancrobactina, que activa la expresión del receptor FvtA.

El análisis de la presencia de los genes de este sistema en una colección de cepas de *V. anguillarum* representativa de los diferentes serotipos, mostró que todas las cepas poseen los genes de síntesis y transporte de vancrobactina, lo que sugiere que este es el sistema de sideróforos ancestral en *V. anguillarum* y que el sistema codificado en el plásmido pJM1 es evolutivamente más reciente. Por último hemos demostrado que *V. anguillarum* puede utilizar, por medio del receptor FvtA, análogos sintéticos de vancrobactina como fuente de hierro. Este hecho, junto con la expresión demostrada de *fvtA* en una colección de cepas de los principales serotipos patógenos, abre la posibilidad de explotar este sistema de transporte de hierro para el diseño de nuevos agentes antimicrobianos contra la vibriosis, basados en sideróforos conjugados con antibacterianos, que puedan utilizar la misma vía de entrada en la célula que el sideróforo nativo.

Agradecimientos

Durante los años que duró este trabajo de investigación han sido muchas las personas que me han brindado su apoyo. A todas ellas muchas gracias. En especial...

A los doctores Manuel L. Lemos y Carlos R. Osorio, directores de esta tesis, mi más sincera gratitud por su confianza, disposición y paciencia.

A la gente que pasó por el laboratorio, en especial a Lucía, y a los compañeros actuales: Amable, Fran y Macamen por crear un inmejorable ambiente de trabajo y ofrecerme siempre su colaboración desinteresada.

A todo el departamento: Alicia, Juan, Bea, Sol y sus chicas, virólogos, etc. por prestarme su ayuda siempre que la necesité.

A todas las personas que me rodean: familia, amigos y a Pili, que estuvieron a mi lado en todo momento con cariño, comprensión y constante estímulo.

Abreviaturas

Amp: Ampicilina

CAS: Cromo Azurol S

CM9: Medio Mínimo de Miller suplementado con Casaminoácidos al 0,2%

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

ddNTP: 2'-3'-dideoxiribonucleósidos 5'-trifosfato

DBS: 2,4'-dihidroxibenzoil-serina

DHBA: Ácido 2,3-dihidroxi-benzoico

DO: Densidad Óptica

Dipiridil: 2,2'-dipiridil. Quelante de hierro

EDDA: Ácido etilen-diamino-di-(o-hidroxifenilacético). Quelante de hierro

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

FAC: Citrato férrico amónico

Gm: Gentamicina

I-PCR: PCR inversa

IPTG: Isopropil- β -D-galactósido

Kan: Kanamicina

LB: Medio Luria Bertani

LPS: Lipopolisacárido

NRPS: Sintetasa de péptidos no ribosómicos

PSA: Persulfato amónico

Rif: Rifampicina

RT-PCR: Reverse-Transcriptase PCR

SDS: Dodecil Sulfato Sódico

SSC: Tampón Citrato/Cloruro Sódico

TCBS: Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa

TE: Tampón Tris-EDTA

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

TSA-1: Triptona Soja Agar + 1% NaCl

TSC-1: Caldo de Soja Triptona + 1% NaCl

ONPG: Orto-nitrofenilgalactopiranósido

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactópiranósido

I. Introducción

1. <i>Vibrio anguillarum</i> como agente causal de la vibriosis	7
1.1 Sintomatología y epidemiología	7
1.2 Características generales de <i>V. anguillarum</i>	9
1.3 Diagnóstico del agente causal de la vibriosis	10
1.4 Prevención y tratamiento de los brotes	11
2. Factores de virulencia de <i>V. anguillarum</i>	12
2.1 Componentes de la cápsula y superficie celular	13
2.2 Factores de adherencia, colonización e invasión	13
2.3 Exotoxinas	14
2.4 Adquisición de hierro	15
3. Importancia y disponibilidad del hierro en las infecciones bacterianas	16
3.1 El hierro como elemento limitante	16
3.2 Disponibilidad de hierro en el hospedador	17
3.3 Mecanismos de asimilación de hierro	18
4. Asimilación de hierro basada en la síntesis de sideróforos	19
4.1 Definición	19
4.2 Tipos de sideróforos	19
4.3 Síntesis de sideróforos	21
4.4 Transporte del hierro-sideróforo	28
4.5 Utilización del hierro transportado por sideróforos	33
5. Aplicaciones del transporte de sideróforos	36
6. La homeostasis del hierro: regulación génica	39
6.1 Mecanismo general de regulación transcripcional: la proteína Fur	39
6.2 Otros procesos de regulación	42
7. Mecanismos de asimilación de hierro basados en sideróforos en <i>V. anguillarum</i>	44
7.1 El plásmido pJM1 y el sistema de la anguibactina	44
7.2 Existencia de un sideróforo alternativo en las cepas de <i>V. anguillarum</i> carentes del plásmido pJM1	48

II. Objetivos

III. Material y métodos

1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo	57
2. Purificación de DNA	59
3. PCR y PCR Inversa (I-PCR)	59
4. Clonación de fragmentos de DNA	61
5. Transformación de plásmidos en <i>E. coli</i>	62
6. Secuenciación y herramientas de bioinformática	64
7. Reconstrucción filogenética de los dominios de adenilación	65

8. Clonaje y secuenciación del cluster de genes de la vancrobactina.	65
9. Obtención de una genoteca de cósmidos de la cepa RV22	66
10. Mutagénesis por intercambio alélico	67
11. Complementación de los mutantes con el gen salvaje	72
12. Ensayos de crecimiento en limitación de hierro	73
13. Ensayo de titulación de Fur o FURTA	74
14. Extracción de RNA y realización de RT-PCR (Reverse-Transcriptase PCR)	75
15. Fusiones transcripcionales y ensayos de actividad β -galactosidasa	76
16. Experimentos de alimentación cruzada y bioensayos	79
17. Hibridación DNA-DNA	80
18. Purificación y análisis de proteínas de membrana externa	81
19. Determinación de la estructura química de la vancrobactina	83

IV. Resultados y discusión

1. Identificación de la región cromosómica que codifica el sistema de la vancrobactina	87
1.1 Predicción de <i>orfs</i> y estudio de homologías	92
2. Genes de síntesis de vancrobactina	96
2.1 Síntesis de DHBA: <i>vabA</i> , <i>vabB</i> y <i>vabC</i>	96
2.2 El proceso de ensamblaje: <i>vabE</i> y <i>vabF</i>	101
2.3 Determinación de la estructura química de la vancrobactina	103
2.3.1 Organización modular de VabE, VabB y VabF	105
2.3.2 Determinación química	110
2.4 Activación de los dominios transportadores: <i>vabD</i>	112
2.5 Aumento de la disponibilidad de corismato: <i>vabG</i>	115
2.6 Modelo de biosíntesis de la vancrobactina	117
3. Transporte de hierro-vancrobactina	120
3.1 Determinación del receptor de vancrobactina:	120
4. Otros elementos del sistema	124
4.1 Secreción de vancrobactina: VabS	124
4.2 Utilización del complejo hierro-vancrobactina: VabH	128
4.3 Influencia de VabR sobre la producción de vancrobactina	129
4.4 MbtH	130
5. Distribución del cluster <i>vab</i> en <i>V. anguillarum</i>	132
5.1 Presencia de genes <i>vab</i> en todos los serotipos de <i>V. anguillarum</i>	132
5.2 El gen <i>fvtA</i> es funcional en los serotipos O1, O2 y O3 de <i>V. anguillarum</i>	135
5.3 Presencia de pseudogenes <i>fat</i> en la cepa RV22	136
5.4 Relaciones evolutivas entre los sistemas de la anguibactina y de la vancrobactina	138
6. Regulación génica	140
6.1 Organización transcripcional	140
6.2 Presencia de cajas Fur en las regiones promotoras	142

6.3 Los genes <i>vab</i> se expresan únicamente en condiciones de déficit de hierro: la represión por Fur	143
6.4 Efecto de VabR sobre la expresión de <i>vabG</i>	146
6.5 Efecto de la vancrobactina sobre la expresión de <i>fvtA</i>	149
7. Aplicación del sistema de la vancrobactina para el diseño de nuevos antimicrobianos	152
7.1 Estudio de la actividad biológica de análogos de vancrobactina	152
7.2 Determinación de la vía de entrada de los análogos	158
<u>V. Conclusiones</u>	165
<u>VI. Bibliografía</u>	169
<u>VII. Anexos: artículos derivados de la tesis</u>	
Anexo I	191
<u>Balado, M.</u> , Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2006). "A gene cluster involved in the biosynthesis of vanchrobactin, a chromosome-encoded siderophore produced by <i>Vibrio anguillarum</i> ". <i>Microbiology</i> 152, 3517-28.	
Anexo II	203
<u>Balado, M.</u> , Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2008). "Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vanchrobactin in <i>Vibrio anguillarum</i> ". <i>Microbiology</i> 154, 1400-13.	
Anexo III	217
<u>Balado, M.</u> , Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2009). "FvtA is the siderophore vanchrobactin receptor in <i>Vibrio anguillarum</i> : utility as entry route for vanchrobactin analogues". <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 75, 2775-83.	
Anexo IV	227
Soengas, R. G., Anta, C., Espada, A., Paz, V., Ares, I. R., <u>Balado, M.</u> , Rodriguez, J., Lemos, M. L. & Jimenez, C. (2006) "Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen <i>Vibrio anguillarum</i> serotype O2". <i>Tetrahedron Letters</i> 47, 7113-16.	
Anexo V	231
Soengas, R. G., Larrosa, M., <u>Balado, M.</u> , Rodriguez, J., Lemos, M. L. & Jimenez, C. (2008). "Synthesis and biological activity of analogues of vanchrobactin, a siderophore from <i>Vibrio anguillarum</i> serotype O2". <i>Org. Biomol. Chem.</i> 6, 1278-87.	

I. Introducción

El desarrollo de la acuicultura ha tenido un impulso muy importante en las últimas décadas, representando en la actualidad el 20% del consumo mundial de productos acuícolas. Según estadísticas oficiales del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino de 2007, en nuestro país el volumen de negocio asciende a unos 495 millones de euros anuales, de los cuales aproximadamente el 50% corresponde al cultivo de peces marinos. El cultivo intensivo lleva asociado el aumento en la incidencia de numerosas patologías con las consiguientes pérdidas económicas. El alto valor comercial y las elevadas inversiones en infraestructuras en la acuicultura, hacen que la investigación relacionada con enfermedades que afectan a los cultivos sea de especial interés. Las enfermedades infecciosas son las más importantes por su impacto en la producción de las poblaciones cultivadas. Por otra parte, los patógenos de peces pueden ser un verdadero problema de salud pública llegando a afectar incluso a seres humanos. Una de las patologías con mayor incidencia es la vibriosis causada por diferentes especies del género *Vibrio* y sus brotes constituyen un problema continuo y un factor limitante en el desarrollo de la piscicultura marina en todo el mundo.

1. *Vibrio anguillarum* como agente causal de la vibriosis

1.1 Sintomatología y epidemiología

Sin duda la vibriosis es una de las infecciones bacterianas más graves que pueden padecer los peces marinos. Por regla general la mortalidad es alta (hasta de un 80% en casos de infección aguda) y de curso rápido. Frecuentemente, la mortalidad alcanza el 10-20 % de la población aunque se aplique el tratamiento adecuado. El término vibriosis define una infección sistémica primaria causada por una especie de *Vibrio* patógena como *V. tubiashii*, *V. ordalii*, *V. vulnificus* biotipo 2, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. salmonicida*, siendo la especie *Listonella (Vibrio) anguillarum* la principal responsable de las epizootias (Toranzo & Barja, 1990; Myhr *et al.*, 1991). En Galicia se aisló por primera vez *V. anguillarum* en 1985 (Devesa *et al.*, 1985) y es reconocido desde entonces como el principal agente causal de vibriosis en el cultivo de alevines de rodaballo, aunque también se ha podido aislar esporádicamente a partir de salmón y trucha arcoiris (Toranzo & Barja, 1990).

La vibriosis afecta a una gran variedad de especies de peces, artrópodos y moluscos tanto en poblaciones naturales como en las plantas de cultivo (unas 50 especies diferentes). Desde un punto de vista económico las especies afectadas más importantes son: salmón del Pacífico y del Atlántico (*Oncorhynchus* spp. y *Salmo salar*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), lubina estriada (*Morone saxatilis*), bacalao (*Gadus morhua*) y anguila Japonesa y Europea (*Anguilla japonica* y *Anguilla anguilla*) (Toranzo *et al.*, 1983c; Actis *et al.*, 1999; Toranzo *et al.*, 2005).

Los brotes de vibriosis generalmente tienen lugar entre la primavera y el otoño, cuando la temperatura del agua sube o baja rápidamente. La enfermedad se declara por debajo de los 10-11 °C en peces salmónidos y entre 15-16 °C en peces planos (lenguado, rodaballo, etc.) y anguílidos. El periodo de incubación está directamente relacionado con la temperatura del agua, la virulencia de la cepa y el grado de estrés del hospedador. La vía de entrada no está clara aunque se sabe que las mucosas juegan un papel importante (Olsson *et al.*, 1996; Bordas *et al.*, 1998; O'Toole *et al.*, 2004).

La sintomatología de la enfermedad depende de la especie hospedadora, de su edad y del estadio de la enfermedad. Los peces afectados por vibriosis suelen presentar una septicemia generalizada con hemorragias en la parte ventral y base de las aletas, exoftalmia y opacidad de la córnea. Generalmente el primer síntoma de una posible infección es la inactividad y la falta de apetito, así como un oscurecimiento de la piel y muerte súbita. En el caso de rodaballos jóvenes y salmónidos éstos pueden ser los únicos síntomas aunque a veces se manifiesta una hidropesía periorbital y/o abdominal. La evolución de la infección puede variar entre una fase aguda y otra crónica. En el caso de la evolución aguda, en la piel aparecen protuberancias de color oscuro que se ulceran con un exudado teñido de sangre. Internamente se produce una dilatación y licuación del bazo y riñón. Si la evolución de la enfermedad es crónica, las lesiones de la piel pueden pasar a una granulomatosis, las branquias pierden color y las hemorragias de la cavidad abdominal terminan convirtiéndose en adherencias fibrinosas entre las vísceras.

1.2 Características generales de *V. anguillarum*

V. anguillarum es un microorganismo de distribución mundial, descrito por primera vez en 1909 como el responsable de la infección denominada “peste roja de las anguilas” (Bergman, 1909).

Morfológicamente *V. anguillarum* es un bacilo Gram-negativo curvado, de 0,5 x 1,0 a 2,0 μm , y móvil por medio de un flagelo polar (Figura I.1). Bioquímicamente se caracteriza por ser anaerobio facultativo con capacidad de fermentar la D-glucosa sin producción de gas. Crece en el medio selectivo y diferencial para vibrios TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa)

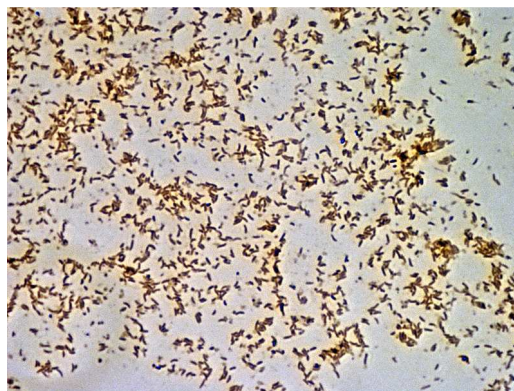


Figura I.1: Tinción Gram de *V. anguillarum*.

con utilización de la sacarosa. Además, es positivo para las pruebas de la oxidasa y Voges-Proskauer y negativo para la descarboxilación de los aminoácidos Lisina y Ornitina, aunque da reacción positiva en la descarboxilación de la Arginina (Figura I.2). Crece bien en la mayor parte de los medios ordinarios suplementados con un 1-1,5% de NaCl (tolera hasta un 6%). Las colonias alcanzan en 48 h y a una temperatura de 25 °C (no crece a 44 °C) una dimensión de 0,5 a 1 mm. Es sensible a un compuesto de pteridina denominado agente vibriostático 129/150 (2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina) y al antibiótico novobiocina (Colwell *et al.*, 1984; Pazos *et al.*, 1993).



Figura I.2: Resultado de la identificación bioquímica de *V. anguillarum* utilizando el sistema de identificación rápida api20E.

En los últimos años la especie *V. anguillarum* ha sufrido continuas revisiones. El antiguo *V. anguillarum* biotipo II constituye en la actualidad la especie *V. ordalii* (Schiewe *et al.*, 1981). Basándose en estudios de la secuencia del rRNA 5S se sugirió la creación de un

género nuevo dentro de la familia *Vibrionaceae*, el género *Listonella*, que englobaría a las especies *V. anguillarum*, *V. damsela* y *V. pelagius* (Macdonell & Colwell, 1985). De este modo estaríamos hablando de *Listonella anguillarum*; sin embargo estudios posteriores no corroboraron dichas conclusiones (Nearhos *et al.*, 1987), por lo que en este trabajo nos referiremos a él como *Vibrio anguillarum* por ser la nomenclatura más universalmente aceptada.

Según la clasificación europea existen un total de 23 serotipos basados en el antígeno O, denominados desde el O1 al O23 (Sorensen & Larsen, 1986; Pedersen *et al.*, 1999a). De estos serotipos sólo se han asociado a brotes de vibriosis cepas del serotipo O1, O2 y algunas del O3, mientras que el resto de serotipos se consideran cepas ambientales (Toranzo & Barja, 1990; Pazos *et al.*, 1993; Toranzo *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 1999b). Los serotipos O1 y O2 tienen un amplio rango de hospedador, por el contrario el serotipo O3 se asocia principalmente a la anguila (*Anguilla anguilla*) y ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Larsen *et al.*, 1994).

Los serotipos O2 y O3 son antigénicamente heterogéneos (Bolinches *et al.*, 1990; Olsen & Larsen, 1993; Santos *et al.*, 1995). El serotipo O2 se subdivide en dos subgrupos: O2a, constituido por aislados de peces tanto salmónidos como no salmónidos y O2b, formado por aislados de peces estrictamente marinos. Asimismo el serotipo O3 se subdivide en el O3a, donde se clasifican las pocas cepas patógenas de este serotipo, y el O3b formado por cepas mayoritariamente ambientales (Toranzo *et al.*, 2005).

1.3 Diagnóstico del agente causal de la vibriosis

Uno de los pasos críticos en el control de un brote infeccioso es la correcta identificación del agente patógeno. En la mayoría de las ocasiones se desarrollan como infecciones asintomáticas, de tal manera que es necesaria la aplicación rutinaria de técnicas de diagnóstico para la detección precoz del brote. Las técnicas de identificación tradicionales se basan en la realización de pruebas morfológicas y bioquímicas, siendo necesaria una confirmación serológica final (Toranzo & Barja, 1990). En *V. anguillarum* el serotipo O2 es el más difícil de serotipar debido a que se producen reacciones cruzadas con *V. ordalii* (Chart & Trust, 1984; Sorensen & Larsen, 1986). A los métodos clásicos, calificados habitualmente

como lentos y tediosos, se van añadiendo sistemas de diagnóstico basados en técnicas moleculares que, a menudo, presentan problemas de especificidad y/o sensibilidad (Osorio & Toranzo, 2002). De entre todos los métodos descritos el publicado por González *et al.* (2003) es el más robusto.

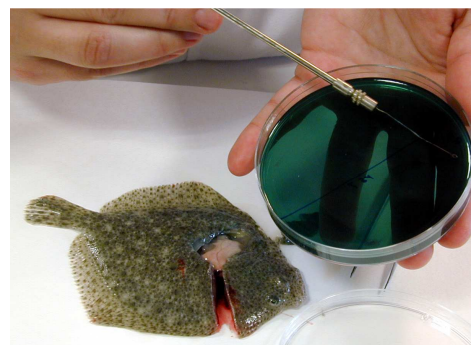


Figura I.3: Proceso de toma directa de muestras a partir de tejidos del pez.

1.4 Prevención y tratamiento de los brotes

La industria de la acuicultura se ve obligada a minimizar las pérdidas debidas a infecciones mediante el uso de vacunas y antibióticos. Son muchas las contraindicaciones generadas por la utilización de antibióticos, entre ellas la posibilidad de generar resistencias (Le *et al.*, 2005; Giraud *et al.*, 2006). Por este motivo, en acuicultura la vacunación se está consolidando como un método fundamental en la prevención de las enfermedades infecciosas. La elección de la vía y dosis de inmunización adecuadas es esencial, se deben administrar de manera que se induzca un alto grado de inmunización para así generar una respuesta duradera, evitando en lo posible generar estrés a los peces. Las vacunas se pueden administrar por tres vías diferentes: (1) inyección, preferentemente intraperitoneal; (2) inmersión, sumergiendo al pez en una solución de la vacuna diluida; o (3) por vía oral suministrándola con los piensos. En las plantas de cultivo se utiliza mayoritariamente la inyección o inmersión como método de inmunización, estando actualmente integrados en los procesos de producción (Gudding *et al.*, 1999).

Las vacunas utilizadas en la acuicultura se obtienen al inactivar cultivos en fase estacionaria con formalina. El proceso de inmunización en el rodaballo, lenguado o lubina suele ser por inmersión, realizándose dos vacunaciones con un intervalo de un mes, generándose así una respuesta humoral específica intensa (Palm *et al.*, 1998; Angelidis *et al.*, 2006). De todas las vacunas comerciales diseñadas frente a *V. anguillarum*, tan sólo la vacuna GAVA-3, desarrollada en nuestro Departamento en la Universidad de Santiago de Compostela, es capaz de proteger al pez frente a los tres grupos antigénicos más

importantes (O1, O2a y O2b) (Toranzo *et al.*, 1997; Bowden *et al.*, 2002). En algunos casos las vacunas polivalentes se han mostrado más efectivas que las derivadas de una única especie bacteriana (Gudding *et al.*, 1999) aplicándose con éxito en el cultivo de salmónidos en los países nórdicos (Toranzo *et al.*, 1997). Los avances en inmunología y biología molecular abren nuevas vías en el diseño de vacunas. Por ejemplo, se han diseñado vacunas a partir de cepas curadas de plásmidos del tipo pJM1, pues la pérdida de este plásmido produce un descenso significativo de la virulencia de *V. anguillarum* O1 (Shao *et al.*, 2005).

Una vez producido el brote infeccioso, la aplicación de antimicrobianos es esencial para el tratamiento de la infección. Para suministrar el antimicrobiano de modo correcto y efectivo hay que tener en cuenta la farmacocinética del compuesto, su concentración mínima inhibitoria (CMI) y respetar la duración del tratamiento, lo cual es específico de cada especie. La principal vía de administración de todos estos medicamentos es la oral al suministrarlos a través de los piensos. Esta metodología permite el tratamiento de grandes cantidades de peces de una forma relativamente fácil y con un coste contenido. El tratamiento en los reproductores se realiza por inyección por ser un método más efectivo y exacto en cuanto a la dosis suministrada.

Las quinolonas son uno de los agentes antibacterianos más utilizados en el tratamiento de infecciones de peces, siendo especialmente activos frente a bacterias Gram-negativas. Este tipo de sustancias inhiben la DNA-girasa provocando la condensación inestable del DNA durante la división celular. Dentro de este grupo la flumequina y el ácido oxolínico son dos de los antibióticos más utilizados en los brotes provocados por *V. anguillarum* (Samuelsen & Bergh, 2004; Vik-Mo *et al.*, 2005). Otro antimicrobiano muy utilizado es el florfenicol, un fármaco sintético con una estructura y espectro de actividad similar al cloranfenicol (Samuelsen *et al.*, 2003).

2. Factores de virulencia de *V. anguillarum*

Podemos considerar como factores de virulencia las propiedades de un microorganismo patógeno que contribuyen a que pueda invadir y colonizar rápidamente al hospedador, alcanzando unos niveles de población altos antes de que la respuesta inmune

limite el crecimiento bacteriano. Los factores de virulencia se pueden clasificar en las siguientes categorías: componentes de la cápsula y superficie celular; factores de adherencia, colonización e invasión; exotoxinas y sistemas de captación de hierro. Rodkhun *et al.* (2006) describieron una extensa lista de posibles genes relacionados con la virulencia de *V. anguillarum* tras secuenciar 1,5 Mb del genoma (1/3 del genoma total). Se describen a continuación algunos de los factores de virulencia que se conocen actualmente en *V. anguillarum*.

2.1 Componentes de la cápsula y superficie celular

Generalmente el suero produce un efecto bactericida sobre los microorganismos, efecto que se atribuye al sistema del complemento. La vía clásica de activación del complemento requiere el reconocimiento previo de los antígenos de la superficie bacteriana por medio de anticuerpos específicos, lo que provoca la polimerización de ciertos componentes del complemento sobre la superficie bacteriana que a su vez promueve su lisis y/o fagocitosis.

Uno de los mecanismos de resistencia al suero consiste en sintetizar en la superficie celular lipopolisacáridos (LPS) con cadenas laterales largas, el denominado antígeno O. Se han caracterizado genes de biosíntesis de lipopolisacáridos tanto en el serotipo O1 como en el serotipo O2 (Amor & Mutharia, 1995; Stroehner *et al.*, 1998). En ambos casos se ha comprobado que aquellas cepas que presenten este antígeno O en su superficie son más resistentes al sistema del complemento (Norqvist & Wolf-Watz, 1993; Boesen *et al.*, 1999); de hecho un aumento en su producción está asociado con un incremento de la virulencia (Aoki *et al.*, 1985).

2.2 Factores de adherencia, colonización e invasión

La adhesión del microorganismo a los tejidos del hospedador es fundamental en el proceso de colonización y multiplicación. *V. anguillarum* es capaz de adherirse a distintos tipos de líneas celulares, lo que implica la producción de adhesinas y factores que provocan efectos citopáticos sobre las células del hospedador (Wang *et al.*, 1998; Ormonde *et al.*, 2000). Las mucosas del pez son la principal vía de entrada del patógeno en el hospedador, en

especial la del intestino, branquias y ciertas zonas de la piel (Olsson *et al.*, 1996; Bordas *et al.*, 1998; O'Toole *et al.*, 2004). La bacteria llega hasta ellas de forma pasiva por la actividad propia del hospedador (O'Toole *et al.*, 2004). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que *V. anguillarum* muestra una respuesta quimiotáctica muy intensa hacia el mucus, en especial hacia el mucus del tracto intestinal que es el más rico en aminoácidos e hidratos de carbono (O'Toole *et al.*, 1999; Larsen & Boesen, 2001). Además es capaz también de adherirse a él y colonizarlo (Bordas *et al.*, 1998; Olsson, 1998). Durante las fases iniciales de entrada en el organismo el flagelo desempeña un papel importante tanto en la motilidad (indispensable en la respuesta quimiotáctica) como en la adhesión y penetración. La mutación de los genes que codifican las flagelinas FlaA, FlaD y FlaE, provoca un descenso significativo en la virulencia de *V. anguillarum* (McGee *et al.*, 1996; Milton *et al.*, 1996).

El crecimiento en el mucus no sólo facilita la multiplicación del patógeno, también induce las actividades necesarias para el éxito de la colonización e invasión de los tejidos del hospedador. Ejemplos de factores expresados específicamente en el mucus son diversas proteínas de membrana externa (García *et al.*, 1997) y la metaloproteasa EmpA (Denkin & Nelson, 2004).

2.3 Exotoxinas

Se definen como proteínas extracelulares secretadas en el hospedador durante la fase de proliferación, que infringen daños en las estructuras de los tejidos facilitando la invasión, diseminación y adquisición de nutrientes. Las exotoxinas identificadas en *V. anguillarum* incluyen varias hemolisinas (Hirono *et al.*, 1996; Rodkhum *et al.*, 2005), proteasas y metaloproteasas (Kodama *et al.*, 1984; Norqvist *et al.*, 1990; Milton *et al.*, 1992; Toranzo & Barja, 1993), dermatotoxinas (Toranzo & Barja, 1993), hemaglutininas y citotoxinas (Toranzo *et al.*, 1983a; Toranzo *et al.*, 1983b; Inamura *et al.*, 1984); relacionadas en mayor o menor medida con la patogenicidad.

El primer gen de hemolisina caracterizado en *V. anguillarum* (*vah1*) lo describieron Hirono *et al.* (1996). Posteriormente se caracterizaron cuatro genes más y se analizó el efecto de este tipo de exotoxinas sobre la virulencia de la bacteria (Rodkhum *et al.*, 2005). Es posible que las hemolisinas secretadas por *V. anguillarum* estén implicadas en el proceso de

patogénesis puesto que la anemia es una de las características de los peces infectados. Sin embargo, todavía existen dudas acerca de la relación entre la producción de estas hemolisinas y la patogenicidad de la bacteria (Toranzo & Barja, 1993). Los cinco genes de hemolisinas descritos en *V. anguillarum* poseen una alta similitud con homólogos identificados en otras especies del género *Vibrio*, como *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000), *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003) o *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003).

Se ha detectado también en *V. anguillarum* la presencia del gen que codifica la toxina RTX (Rodkhum *et al.*, 2006). Este tipo de toxinas pertenecen a una familia de exotoxinas formadoras de poros incluidas dentro de los sistemas de secreción bacteriano de tipo I (TISS), que constituyen un factor de virulencia muy importante en diversos patógenos Gram-negativos (Coote, 1992) e incluyen toxinas citolíticas, metaloproteasas y lipasas. Pese a que se han descrito toxinas RTX en patógenos como *V. cholerae* (Lin *et al.*, 1999), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Jansen *et al.*, 1993) y *Escherichia coli* (Bauer & Welch, 1996), la información disponible acerca de estos factores de virulencia en *V. anguillarum* todavía es muy limitada.

2.4 Adquisición de hierro

En la mayoría de las bacterias patógenas invasivas, se ha comprobado cómo el aumento de la concentración de hierro en el hospedador conlleva una mayor susceptibilidad a las infecciones. Al igual que ocurre con otros muchos microorganismos patógenos Gram-negativos, la capacidad de obtención de hierro es uno de los principales factores de virulencia en *V. anguillarum*. El sistema de captación de hierro más estudiado en esta especie es el que utiliza el sideróforo anguibactina. Este sistema está codificado por un plásmido de gran tamaño (65 kb) denominado pJM1, cuya pérdida o inactivación produce una drástica reducción en la virulencia de la bacteria, lo que indica que es esencial para el desarrollo de la enfermedad (Crosa *et al.*, 1980; Wolf & Crosa, 1986). En el apartado 7.1 se detallan los componentes del sistema de la anguibactina y la distribución del plásmido.

Las cepas patógenas de *V. anguillarum* también pueden utilizar citrato férrico y grupo hemo o hemo-proteínas como fuente de hierro gracias a mecanismos independientes de sideróforos (Mazoy & Lemos, 1991; Mazoy *et al.*, 1997). La acción de hemolisinas y

citotoxinas pone a disposición de las células bacterianas el contenido intracelular, lo que facilita la utilización del grupo hemo como fuente de hierro (Mazoy & Lemos, 1991). Las primeras evidencias que demuestran la capacidad de *V. anguillarum* para unir hemoglobina y hemina, se obtuvieron utilizando cepas de los serotipos O1 y O2 en experimentos de “dot-blot” (Mazoy & Lemos, 1996b). Actualmente sabemos que esta capacidad es extensible al resto de cepas de la especie con independencia del serotipo al que pertenezcan (Mouriño *et al.*, 2005). Se han identificado las proteínas que median la unión de hemina y hemoglobina (Mazoy *et al.*, 1996; Mazoy & Lemos, 1996b) y caracterizado la maquinaria de transporte de grupo hemo (Mazoy *et al.*, 2003; Mouriño *et al.*, 2004). El gen *huvA* codifica el receptor de membrana externa responsable del transporte del grupo hemo, es una proteína de 79 kDa homóloga a receptores ya descritos en *V. cholerae* (Henderson & Payne, 1993) y *V. vulnificus* (Litwin & Byrne, 1998). En el cromosoma, el gen *huvA* forma junto a otros genes el *cluster* de captación y utilización de grupo hemo (Mouriño *et al.*, 2004): *huvBCD*, que codifican el transportador de tipo ABC necesario para atravesar la membrana celular; *huvR*, que codificaría un regulador transcripcional; *huvX*, de función desconocida; *huvZ*, que se relaciona con procesos de almacenamiento; y por último *tonB1*, *exbB1* y *exbD1* que constituyen el sistema TonB1 (Stork *et al.*, 2004).

3. Importancia y disponibilidad del hierro en las infecciones bacterianas

3.1 El hierro como elemento limitante

Dependiendo de la molécula a la que esté unido, el hierro puede adoptar una de las dos formas de carga iónica positiva (Fe^{+2} o Fe^{+3}) variando así mucho su potencial redox. Esta es la razón por la que está presente en los centros activos de enzimas que catalizan reacciones redox, ya sea por sí solo, incorporado en complejos hierro-azufre (proteínas Fe/S) o en el grupo hemo. Estas enzimas son indispensables para la vida pues participan en todo tipo de procesos celulares: transporte de electrones, activación de oxígeno, reducción del peróxido, síntesis de aminoácidos y nucleósidos, síntesis de ADN y fotosíntesis.

El hierro es por tanto un compuesto esencial para la mayoría de los organismos vivos. Sin embargo, a pesar de su abundancia en la tierra y de la concentración micromolar requerida para el crecimiento celular, es un compuesto biológicamente limitante en la mayoría de los entornos. En ambientes inorgánicos aeróbicos y entornos de pH neutro, el hierro se presenta esencialmente en la forma oxidada (Fe^{+3}) generándose agregados insolubles. Cuando está reducido, el ión ferroso es altamente tóxico, ya que activa la reacción de Fenton ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^- + \text{OH}$) produciendo la reducción parcial del oxígeno y dando lugar a radicales hidroxilo que tienen efectos nocivos en la mayoría de las macromoléculas. De este modo, la forma Fe^{+3} es insoluble y no está biodisponible, mientras que la forma Fe^{+2} es potencialmente tóxica. A lo largo de la evolución los organismos han adquirido diversas estrategias para protegerse de los efectos nocivos del hierro, desarrollando mecanismos que lo sequestran del medio extracelular manteniéndolo en proteínas portadoras o uniéndolo a anillos de protoporfirina en hemoproteínas.

3.2 Disponibilidad de hierro en el hospedador

La homeostasis del hierro está tan estrictamente regulada que no existe prácticamente hierro libre en los organismos vivos (Ratledge & Dover, 2000; Wandersman & Delepelaire, 2004). En los vertebrados superiores, el hierro se asimila desde la dieta y se transporta en la sangre unido a la transferrina. Principalmente existen tres tipos de transferrinas: transferrina del suero; ovotransferrina en la albúmina del huevo y lactoferrina en numerosos fluidos extracelulares. La transferrina humana tiene un peso aproximado de 80 kDa. Tiene dos sitios de unión a Fe^{+3} con una constante de afinidad de 10^{36} y un nivel de saturación del 30%, lo que le permite tamponar situaciones puntuales de exceso de hierro libre haciendo que su concentración sea en todo momento prácticamente 0 ($\approx 10^{-18}$ M) (Bullen *et al.*, 1978).

En los animales la proteína de almacenamiento de hierro es la ferritina, en plantas la fitoferritina y en microorganismos las bacterioferritinas. Cuando no están cargadas de hierro se denominan apoferritinas y tienen un peso molecular que oscila entre 430 y 480 kDa. La ferritina está compuesta por 24 subunidades que pueden almacenar más de 4000 átomos de Fe^{+3} formando un macro complejo de unos 900 kDa.

Por tanto, las bacterias están en condiciones restrictivas de hierro independientemente de su biotopo. Cuando crecen en un medio acelular (acuático o medio sólido) las bacterias encuentran principalmente el ión insoluble (Fe^{+3}) y cuando colonizan organismos multicelulares la disponibilidad de hierro es, como ya hemos explicado, prácticamente cero (Martinez *et al.*, 2006).

3.3 Mecanismos de asimilación de hierro

Por todo lo expuesto, los sistemas de captación de hierro, presentes en los microorganismos patógenos, juegan un papel clave en el establecimiento de la infección. Para adquirir el hierro presente en el hospedador, los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias: interacción directa con las proteínas del hospedador que transportan el hierro (transferrinas, lactoferrina, hemoglobina, etc.); reducir el hierro para aumentar su solubilidad por medio de reductasas extracelulares ($\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$); y secuestrar y transportar el ión Fe^{+3} por medio de un transporte activo (Winkelmann & Van der Helm, 1987; Guerinot, 1994). Habitualmente un microorganismo patógeno dispone de varias de estas estrategias que pueden actuar simultáneamente o en momentos diferentes durante la infección. Por ejemplo, *V. cholerae* dispone de varios sistemas de captación que le permiten utilizar como fuente de hierro: el ión Fe^{+2} (genes *feoABC*), ión Fe^{+3} (*fbpABC*), grupo hemo (*hutABCD*), el sideróforo vibriobactina (*viuAPDGC*) y varios sideróforos exógenos como el ferricromo (*fhuABCD*) y la enterobactina (*irgA* y *vctAPDGC*) (Wyckoff *et al.*, 2007).

El mecanismo de captación de hierro más ampliamente utilizado por los microorganismos es la secreción de sideróforos (Wandersman & Delepelaire, 2004). Una vez secretados, éstos se unen al hierro extracelular con una constante de afinidad entre 10^{30} y 10^{52} . Estas elevadas afinidades de los sideróforos por el Fe^{+3} posibilitan que puedan competir no sólo por el hierro libre, sino también arrebatarlo de las fuentes de reserva del hospedador como la ferritina (Ratledge & Dover, 2000).

Junto a los mecanismos de captación de hierro propiamente dichos, los microorganismos patógenos producen enzimas que incrementan la eficiencia de estos sistemas. Por ejemplo, algunos secretan hemolisinas que lisan a los eritrocitos liberando así un contenido celular muy rico en hemoglobina (Genco & Dixon, 2001). Otro modo es

secretar proteasas que degradan proteínas transportadoras de hierro, por ejemplo *Porphyromonas gingivalis* sintetiza la proteinasa Kgp, que se une y degrada hemoglobina, hemopexina y transferrina.

4. Asimilación de hierro basada en la síntesis de sideróforos

4.1 Definición

Los sideróforos actúan como agentes solubilizadores de hierro a partir de compuestos minerales u orgánicos como la lactoferrina y transferrina en vertebrados. En su mayoría se trata de péptidos de bajo peso molecular producidos por microorganismos (Neilands, 1995). Los sideróforos son sintetizados y secretados al medio extracelular, donde se unen al hierro y se recuperan gracias

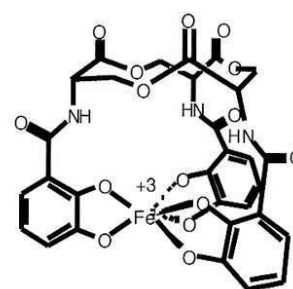


Figura I.4: Hierro-enterobactina

a transportadores específicos. En las bacterias Gram-negativas este proceso se realiza gracias a un receptor de membrana externa acoplado a un transportador de tipo ABC. Una vez en el citoplasma el hierro debe liberarse del complejo hierro-sideróforo, proceso que se lleva a cabo por degradación enzimática del complejo o por reducción del hierro.

4.2 Tipos de sideróforos

La mayoría de los sideróforos forman un centro de unión hexadentado, ya que su estructura química suele constar de tres grupos ligando dobles dispuestos alrededor de un ión férrico central (Figura I.4) (Albrecht-Gary & Crumbliss, 1998). Los sideróforos hexadentados forman complejos 1:1 con el ión férrico, de tal modo que la liberación del ión es poco probable, disminuyendo así su toxicidad potencial (Tilbrook & Hider, 1998). Los grupos de unión a hierro están incluidos en una estructura química mayor que maximiza su eficiencia. Dependiendo de la naturaleza del grupo que media la unión con el átomo de hierro, los sideróforos se pueden dividir en tres tipos básicos: catecoles, hidroxamatos y α -hidroxi-carboxilatos, si bien se han descrito sideróforos de tipo mixto que contienen en su estructura varios tipos de grupos de unión.

- 1) Catecoles: su centro de unión deriva del corismato (Figura I.5). A su vez se pueden clasificar en catecoles *sensu stricto* (formados por ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA)) o fenolatos (compuestos por ácido salicílico). La enterobactina es el sideróforo más estudiado de este grupo, lo producen cepas de *E. coli* y otras enterobacterias (Crosa & Walsh, 2002; Raymond *et al.*, 2003). Este sideróforo presenta una de las constantes de disociación del hierro más elevadas (10^{52}) lo que le permite competir con las transferrinas. Se puede detectar la presencia de este tipo de compuestos en sobrenadantes de cultivo utilizando la reacción de Arnow. Este reactivo reacciona específicamente con los grupos catecol dando una coloración rosácea proporcional a la cantidad presente en la muestra (Arnow, 1937).

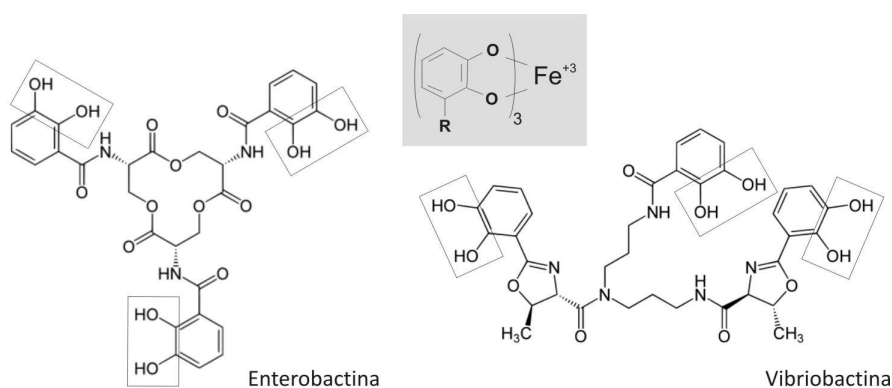


Figura I.5: Grupo funcional y ejemplo de sideróforos de tipo catecol.

- 2) Hidroxamatos: del tipo de la aerobactina producida por *Salmonella* spp., *Shigella flexneri* y algunas cepas de *E. coli* (Figura I.6) (de Lorenzo & Martinez, 1988; Hale, 1991; Kingsley *et al.*, 1995). La aerobactina presenta una constante de disociación muy parecida a las transferrinas ($\approx 10^{25}$) por lo que compite con otras fuentes como la ferritina (Ratledge & Dover, 2000).

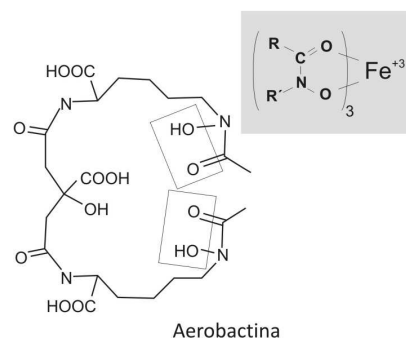


Figura I.6: Grupo funcional y ejemplo de sideróforo de tipo hidroxamato.

- 3) Ácidos α -hidroxicarboxílicos: un ejemplo es el sideróforo acromobactina derivado del citrato (Figura I.7). Este sideróforo lo produce *Erwinia chrysanthemi*, especie que produce simultáneamente dos sistemas de sideróforos diferentes: acromobactina y crisobactina (de tipo catecol) (Franza *et al.*, 2005).

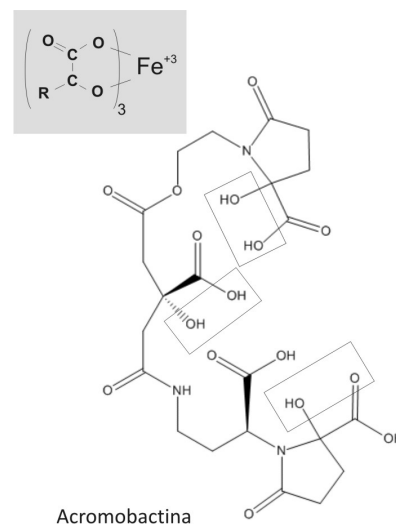


Figura I.7: Grupo funcional y ejemplo de sideróforos tipo α -hidroxicarboxílico.

- 4) Mixtos: como la anguibactina que contiene en su estructura dos grupos de unión a hierro: un grupo catecol y uno de tipo hidroxamato, por lo que se consideraría este sideróforo como de tipo catecol-hidroxamato (ver apartado 7.1) (Figura I.8).

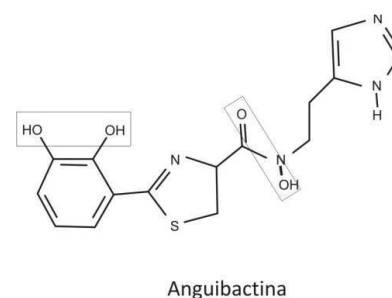


Figura I.8: Ejemplo de sideróforo de tipo mixto. Se marcan con rectángulos los grupos de unión a hierro.

4.3 Síntesis de sideróforos

Actualmente se han descrito más de 500 sideróforos diferentes. La mayor parte son de naturaleza peptídica y se sintetizan mediante enzimas de la familia de las péptido-sintetasas no ribosómicas (NRPS). Los sideróforos que no son polipéptidos, formados por ácido dicarboxílico, diamina o amino alcohol, se sintetizan por sintetasas específicas en lo que se conoce como Síntesis Independiente de NRPS. En los últimos años se han descrito tanto

nuevas rutas como componentes nuevos de ellas, de tal manera que se conoce en detalle la enzimología de la biosíntesis de muchos sideróforos.

4.3.1 Síntesis por NRPS

Las NRPS son grandes complejos enzimáticos multimodulares que seleccionan, activan y ensamblan una amplia gama de amino-, carboxi- e hidroxí-ácidos para formar una gran diversidad de péptidos o policétidos (Policétido sintetasas, PKS) (Marahiel *et al.*, 1997). Las diferentes funciones catalíticas las ejercen los dominios que forman los módulos, de tal manera que el número de módulos, estructura, especificidad y organización determina la estructura química del compuesto a sintetizar. Durante el proceso de síntesis las NRPS pueden actuar solas o en colaboración con otras enzimas como halogenasas, glicosil transferasas, etc. que catalizan modificaciones finales en la estructura del compuesto. Podemos identificar los diferentes dominios gracias a motivos conservados en la secuencia de aminoácidos. Los dominios básicos son:

(1) **dominio de adenilación** (A) que reconoce específicamente un aminoácido o hidroxíácido y lo activa por adenilación.

(2) **dominio transportador** (*Peptidyl/Aryl Carrier Protein* (PCP/ArCP)) al que queda unido el compuesto activado mediante un enlace tioéster al 4'-fosfopanteteinil (4'PPant) que actúa a modo de cofactor. Los dominios transportadores (formas apo-ArCP y apo-PCP) deben ser activados por una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) para así disponer de un sistema de NRPS funcional.

(3) **dominio de condensación** (C) que cataliza la reacción de elongación entre la cadena peptídica en formación y el péptido unido al PCP de su módulo.

(4) **dominio tioesterasa** (TE) situado en posición C-terminal libera la cadena de péptidos naciente de la NRPS por medio de una ciclación intra- o intermolecular.

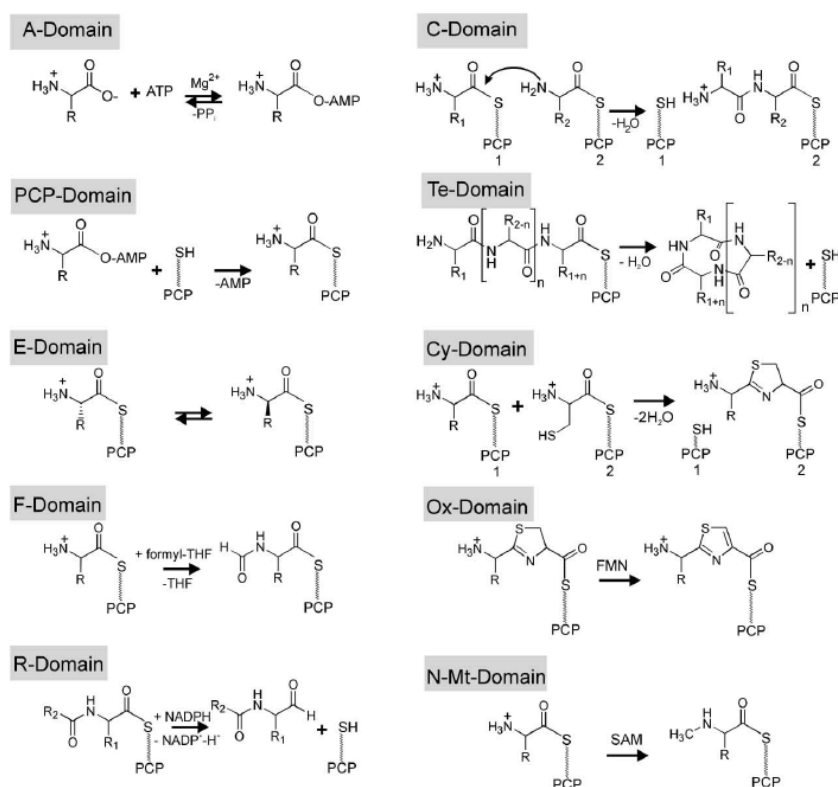


Figura I.9: Dominios presentes en las NRPS y reacciones que catalizan (Schwarzer *et al.* 2003).

El peculiar mecanismo de síntesis de las NRPS hace que los dominios se combinen formando tres tipos básicos de módulos: El **módulo de iniciación**, selecciona la primera molécula a la que se le añadirán los demás compuestos, se sitúa en posición N-terminal y está formado por los dominios A-PCP o A-ArCP; uno o varios **módulos de elongación** que incorporan de modo secuencial diferentes compuestos y tienen una estructura básica C-A-PCP; finalmente en posición C-terminal nos encontramos con el **módulo de terminación** que añade el último constituyente y libera el compuesto final, este módulo tendría la estructura C-A-PCP-TE.

A estas estructuras básicas de módulos se les pueden añadir otra serie de dominios que catalizan modificaciones estructurales: metiltransferasa (MT), ciclaciones (Cy), epimerizaciones (E), reducciones (KR), deshidrataciones (DH), etc. (Figura I.9). La presencia de este tipo de dominios adicionales y la gran amplitud de sustratos que pueden utilizar las NRPS explica la gran diversidad estructural que caracteriza a los péptidos no ribosómicos. Hasta la fecha se han identificado más de 300 residuos capaces de servir como sustrato de

las NRPS, entre los que se incluyen D-aminoácidos, β -aminoácidos, diversos ácidos con grupos hidroxilo y ácidos N-metilados (von Dohren *et al.*, 1999). Hay que resaltar que los diferentes dominios necesarios para la formación de un determinado compuesto pueden localizarse físicamente en una o en varias proteínas que actuarán de modo secuencial (Figura I.10) (Schwarzer *et al.*, 2003).

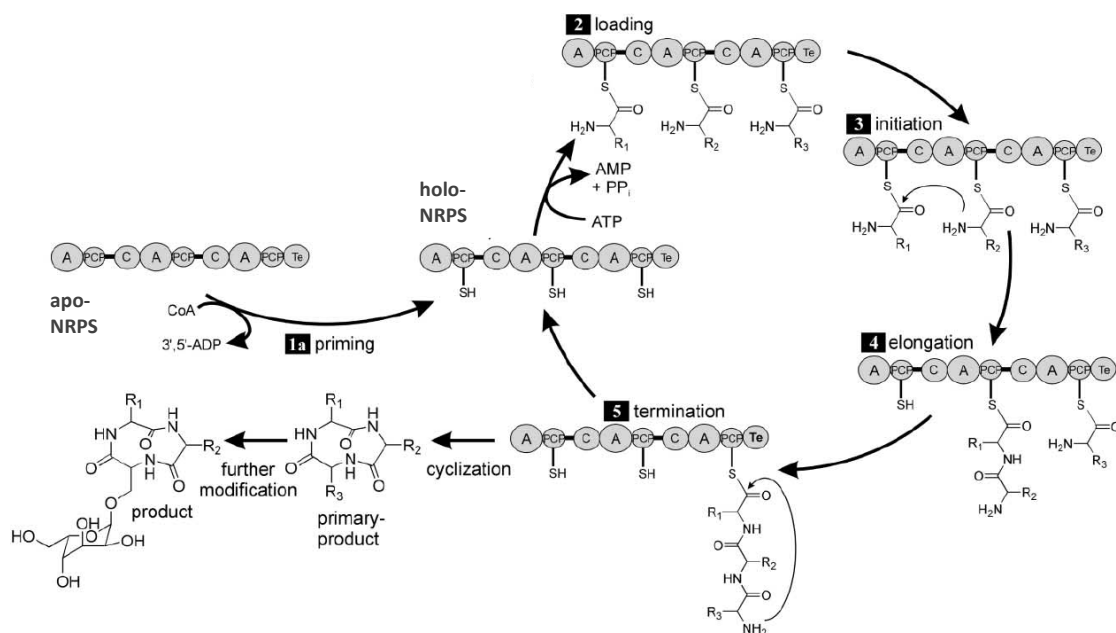


Figura I.10: Etapas de la síntesis no-ribosómica utilizando un péptido ficticio a modo de ejemplo (Schwarzer *et al.* 2003).

Como paso previo al proceso de ensamblaje, los constituyentes a incorporar por las NRPS deben sintetizarse en sus respectivas rutas. Este es el caso del DHBA o del ácido salicílico que definen a los sideróforos de tipo catecol (catecoles y fenolatos respectivamente). Ambos compuestos derivan del corismato, uno de los intermediarios de la ruta de síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). Las enzimas que catalizan su conversión suelen estar físicamente localizadas junto a las NRPS que catalizan el ensamblaje final del sideróforo (Fischbach *et al.*, 2008).

4.3.1.1 Síntesis de DHBA (Catecoles)

La ruta de síntesis de los sideróforos de tipo catecol comienza con la conversión de corismato en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA) (Figura I.11). Todas las rutas conocidas

poseen homólogos de los genes de *E. coli* *entC*, *entB* y *entA* que codifican una isocorismato sintasa, una isocorismatasa y una 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa, respectivamente, necesarias para catalizar esta conversión. EntB es una enzima bifuncional que contiene dos dominios conservados: un dominio de actividad isocorismatasa en su extremo N-terminal y un dominio ArCP (Aryl Carrier Protein) en su extremo C-terminal que intervendrá en el proceso de ensamblaje. Se han descrito homólogos de los genes *entCBA* en la mayoría de los sistemas de síntesis de catecoles. Por ejemplo, en *V. cholerae* los genes del sistema de la vibriobactina se agrupan en dos regiones cromosómicas distantes entre sí, aunque ambas están en el cromosoma 1. Una de ellas incluye los genes de transporte *viuA* y *viuB*, y el gen de biosíntesis *vibF*. En la otra región se localizan *vibA*, *vibB* y *vibC*, homólogos de *entCBA*, junto a *vibE* y el transportador tipo ABC necesario para la internalización de hierro-vibriobactina (genes *viuPDHC*) (Crosa & Walsh, 2002).

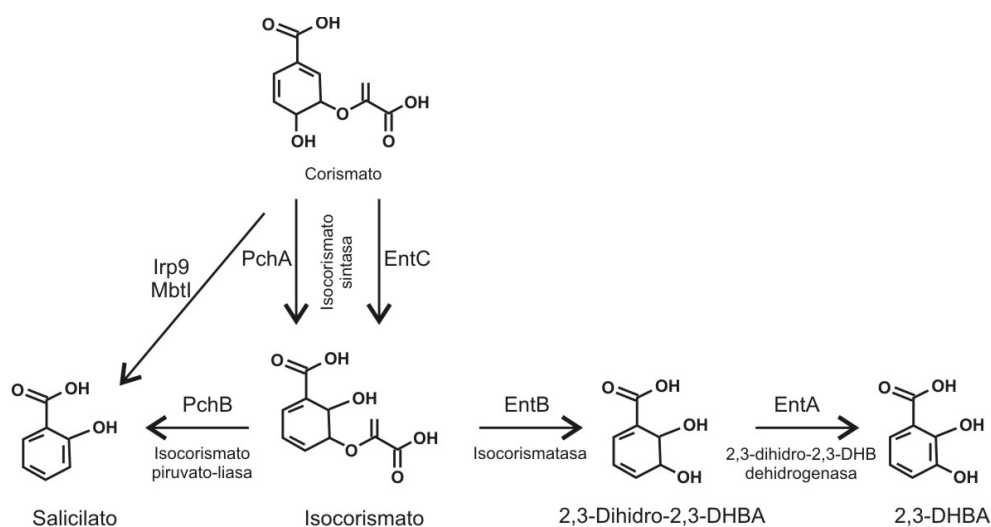


Figura I.11: Síntesis de salicilato o 2,3-DHBA a partir del corismato. Irp9 de *Y. enterocolitica*, MbtI de *M. tuberculosis*, PchA y B de *P. aeruginosa* y EntC B y A de *E. coli*.

4.3.1.2 Síntesis de salicilato (Fenolatos)

Se han descrito dos alternativas para la conversión de corismato en salicilato. En unos casos interviene una salicilato sintasa, por ejemplo Irp9 (YbtS) de *Y. enterocolitica* (Kerbarh *et al.*, 2005) o MbtI en *M. tuberculosis* (Harrison *et al.*, 2006). En otras especies, en esta conversión intervienen dos enzimas, por ejemplo en *P. aeruginosa* interviene una

isocorismato sintasa (PchA, homólogo de EntC) y una isocorismato-piruvato liasa (PchB) (Gaille *et al.*, 2002; Gaille *et al.*, 2003) (Figura I.11). En miembros de la familia *Vibrionaceae* como *V. cholerae*, *Photobacterium profundum* o *P. damsela* subsp. *piscicida* se han descrito *clusters* de genes con similitud a la isla de patogenicidad HPI de *Yersinia*, que contienen genes *irp* homólogos al gen *irp9*, que podrían codificar salicilato sintasas. Por tanto, cepas de las tres especies arriba citadas podrían producir y utilizar sideróforos que contienen ácido salicílico en su estructura (Vezzi *et al.*, 2005; Osorio *et al.*, 2006).

4.3.1.3 Selección de sustrato

Una vez sintetizados todos los constituyentes del sideróforo, actúan las NRPS. Como hemos visto, la estructura modular de las NRPS define el péptido a sintetizar. Cada módulo activa uno de los componentes y lo incorpora al péptido naciente. Todos los dominios del módulo intervienen de algún modo en la selección de sustrato (Lautru & Challis, 2004), sin embargo el dominio de adenilación es el más importante a la hora de reconocer el residuo apropiado y activarlo por adenilación (Stachelhaus *et al.*, 1999).

En los últimos años se han cristalizado numerosos dominios de adenilación. Gracias a las estructuras tridimensionales obtenidas y al alineamiento de secuencias se ha acotado una región denominada *Substrate-binding pocket* de aproximadamente 100 aminoácidos. La conformación tridimensional de esta región delimita un hueco en cuyo interior debe acoplarse el sustrato. Las posibles combinaciones de aminoácidos presentes en 9 posiciones claves en la interacción con el sustrato se conocen como “código no-ribosómico” (Figura I.12) (Conti *et al.*, 1997; Di Vincenzo *et al.*, 2005; Rausch *et al.*, 2005), gracias al cual se puede predecir el sustrato que se va a incorporar en el producto final.

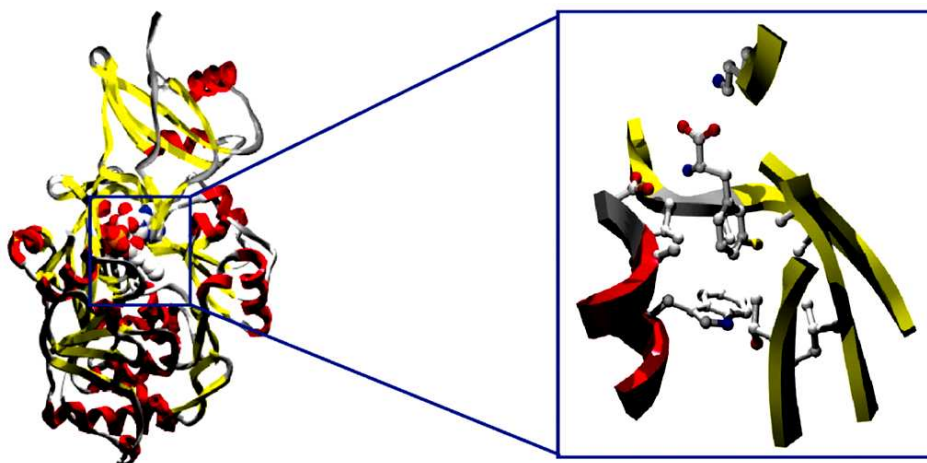


Figura I.12: Estructura tridimensional del *substrate-binding pocket* de GrsA con afinidad por la L-fenilalanina, y detalle de las 9 posiciones que interaccionan con el sustrato (Lautru & Challis, 2004).

4.3.2 Sistemas independientes de NRPS

La mayor parte de los sideróforos de tipo hidroxamato y carboxilato se sintetizan mediante sistemas independientes de NRPS (*NRPS Independent System*, NIS). Durante casi una década, la aerobactina ha sido el único ejemplo de sideróforo sintetizado de modo independiente de las NRPS. Sin embargo, en los últimos años se han descrito rutas similares para numerosos sideróforos: rhizobactina 1021, alcaligina, desferrioxaminas, vibrioferrina, staphylobactina, anthrachelina, achromobactina, etc. Todos ellos utilizan enzimas con gran homología a las sintetetas de aerobactina (Challis, 2005). Este tipo de vías están presentes en unas 40 especies diferentes, algunas potencialmente patógenas como *E. coli* o *Staphylococcus aureus*, en las que se ha demostrado que la expresión de este tipo de genes tiene una clara incidencia en la patogenicidad (Dale *et al.*, 2004).

La aerobactina media la adquisición de hierro en numerosas cepas patógenas de *E. coli*. El sistema de la aerobactina lo componen cinco genes: cuatro relacionados con la síntesis (*iucABCD*) y uno que codifica el receptor de membrana externa (*iutA*) (de Lorenzo *et al.*, 1986). Este sistema se identificó por primera vez en el plásmido pColV-K30 pero su localización puede ser tanto plasmídica como cromosómica. La función de cada uno de los genes se esquematiza en la Figura I.13; dichas funciones fueron descritas por Neilands y colaboradores en los años 80 utilizando una colección de mutantes (de Lorenzo *et al.*, 1986).

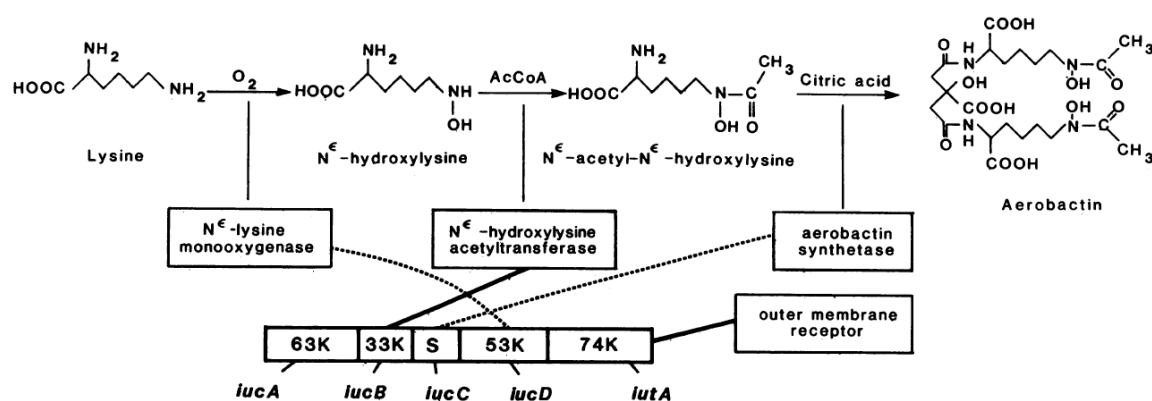


Figura I.13: Esquema de síntesis de la aerobactina (de Lorenzo *et al.*, 1986)

4.4 Transporte del hierro-sideróforo

Una vez en el medio extracelular el sideróforo se une al Fe^{+3} , tras lo cual el complejo hierro-sideróforo debe ser captado y transportado hasta el interior celular. Los microorganismos disponen de vías de transporte específicas para el hierro-sideróforo nativo y a menudo también para el transporte de sideróforos producidos por otros microorganismos de su mismo ecosistema, con lo que se adquiere una clara ventaja competitiva (Ratledge & Dover, 2000). La maquinaria necesaria está compuesta por un receptor específico de membrana externa dependiente del sistema TonB y un transportador de tipo ABC para atravesar la membrana plasmática.

4.4.1 Receptores de membrana externa y sistemas TonB

Los receptores de membrana externa son proteínas integrales de membrana en la que delimitan un canal formado por láminas- β , el cual está cerrado por un dominio globular que actúa a modo de tapón. Este dominio, situado en el lumen del poro, está formado también por láminas- β y es en él donde se localiza el sitio de unión al ligando. En la interacción ligando-receptor intervienen diez aminoácidos del tapón y hace que se secuestre el ligando del solvente extracelular. Esta interacción produce un cambio conformacional de la barrera de láminas- β y de los *loops* extracelulares del receptor. Para liberar el sustrato de la zona de unión es necesario revertir el cambio conformacional, proceso que es dependiente de energía. La energía necesaria para la internalización (movimiento del tapón y la liberación del ligando) proviene de la fuerza protón-motriz de la membrana citoplasmática. El sistema

TonB formado por las proteínas TonB, ExbD y ExbD media la transducción de energía desde la membrana citoplasmática a la membrana externa (Figura I.14).

A diferencia de otras bacterias Gram-negativas que poseen un único sistema TonB, en *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998) y otros vibrios (O'Malley *et al.*, 1999) es frecuente la presencia de dos sistemas TonB funcionales. El sistema TonB2 forma un operon junto a una *orf*

denominada *ttpC*, cuya presencia es esencial para la funcionalidad del sistema, por lo que se cree que TtpC debe ser un constituyente común en todos los sistemas TonB2 de los vibrios (Stork *et al.*, 2007b). En *V. anguillarum* la función de ambos sistemas (TonB1 y TonB2) no es completamente redundante. Mientras que la captación de sideróforos está vinculada a la presencia del sistema TonB2, el transporte del grupo hemo utiliza indistintamente tanto el sistema TonB1 como el TonB2 (Stork *et al.*, 2004; Lemos & Osorio, 2007).

La transducción de energía generada por la fuerza protón-motriz, mediada por las proteínas ExbB/D y el dominio transmembrana de TonB, se produce al adquirir el extremo C-terminal de TonB una conformación de alta energía (Ghosh & Postle, 2005). Este estado de alta energía induce un cambio conformacional en los transportadores de membrana externa, de tal manera que los sustratos se liberan de sus sitios de unión y el tapón se mueve, ya sea al lado o fuera de las láminas- β , para permitir la difusión de los sustratos a través del poro hacia el periplasma (Braun & Endriss, 2007).

Se desconoce el modo en el que TonB almacena la energía hasta que se produce la interacción con un receptor cargado de ligando. Actualmente se postulan varios modelos, uno de los cuales plantea la translocación de TonB excitado de la membrana citoplasmática a la membrana externa. Este modelo está apoyado, entre otras observaciones, en que el 40% de TonB se localiza en la membrana externa. En el proceso de translocación participarían proteínas asociadas al peptidoglicano como Lpp y OmpA (Higgs *et al.*, 2002; Postle & Kadner, 2003).

La región N-terminal del receptor participa en el contacto con TonB y se denomina “caja TonB” (Lundrigan & Kadner, 1986; Gudmundsdottir *et al.*, 1989; Nau & Konisky, 1989;

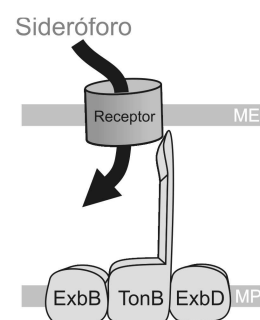


Figura I.14: Representación del sistema de transducción de energía TonB.

Ferguson & Deisenhofer, 2004), aunque participan también ciertos aminoácidos del dominio tapón (Figura. I.15) (Braun *et al.*, 2003a). Cuando se elimina el tapón, ciertos *loops* situados en la cara extracelular del receptor cierran el poro, lo que constituye un mecanismo de seguridad que protege a la célula de una eventual despolarización. La interacción entre ambos extremos, receptor-TonB, se ha demostrado en numerosos receptores y con metodologías diferentes. Por ejemplo, mediante estudios de mutagénesis de FecA, receptor de citrato férrico (Ogierman & Braun, 2003); o utilizando estudios de cristalografía en el caso del receptor FhuA (Pawelek *et al.*, 2006), ambos de *E. coli*.

Es habitual que los microorganismos dispongan de numerosos receptores dependientes de TonB destinados a la captación de hierro (transporte de sideróforos y grupo hemo), pero también al transporte de sustancias como la vitamina B12. Por ejemplo, en el genoma de *E. coli* se encuentran los receptores FhuA, IutA, y FhuE, que transportan sideróforos de tipo hidroxamato; FepA, Cir, y Fiu, que transportan catecoles; FecA media la internalización de sideróforos de tipo carboxilato como el ferricromo, mientras que BtuB es el receptor de la vitamina B12 (Ferguson & Deisenhofer, 2004). *V. cholerae* también dispone de numerosos receptores de esta familia: FhuA transporta ferricromo; ViuA es el receptor de vibriobactina; IrgA y VctA, que median el transporte de catecoles como la enterobactina; HutA, HutR y HasR, que participan en la captación del grupo hemo y un receptor homólogo a BtuB que codificaría el receptor de la vitamina B12 (Wyckoff *et al.*, 2007).

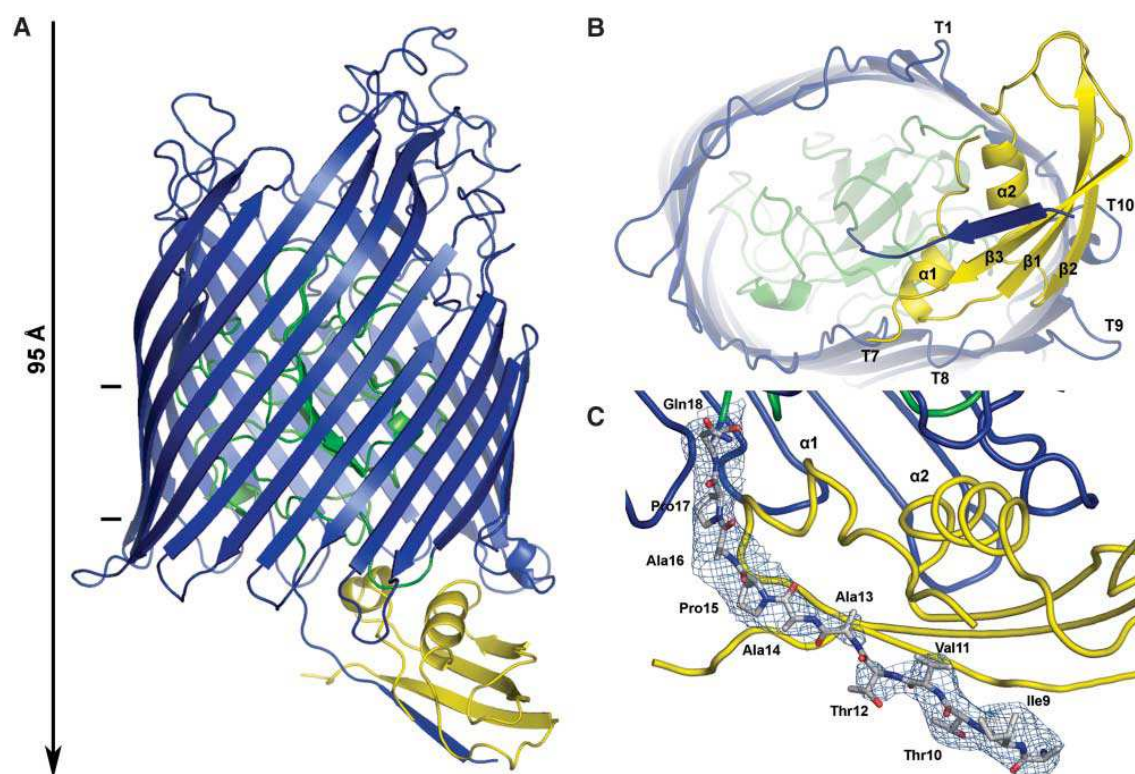


Figura I.15: Estructura tridimensional del complejo FhuA-TonB de *E. coli* (A) Representación conformacional de FhuA; las láminas- β se representan como flechas planas, α -hélices como cordones. El tapón “cork domain” se representa en verde (del residuo 19 al 169) el resto de los residuos se colorean en azul (8-18; 161-725). También se representan la región de TonB que interacciona con el receptor (residuos 158-135). La flecha representa la dirección del transporte y las dos rayas la posición en la que se sitúan la doble membrana lipídica. (B) Vista del complejo FhuA-TonB a lo largo del eje longitudinal del poro delimitado por las láminas- β . Se muestran detalles de los elementos periplasmáticos de la estructura secundaria de FhuA (α -hélice-giro: T1-T10) y TonB (α -hélices: α 1, α 2. Láminas- β : β 1, β 2, β 3). (C) Detalle de la interacción FhuA-TonB. Se representan como átomos coloreados los residuos que componen la “caja TonB” (8-18, Átomos de carbono en gris, oxígeno en rojo y nitrógeno en azul) (Pawelek *et al.*, 2006).

4.4.2 Transportadores de tipo ABC

Hasta ahora hemos hablado de los receptores específicos que transportan el hierro-sideróforo desde el medio extracelular al espacio periplásmico. El hierro-sideróforo aún tiene que pasar otra barrera, la membrana citoplasmática, pero para ello usará un transportador de tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*).

Los transportadores de tipo ABC son proteínas integrales de membrana que transportan de forma activa y a favor de gradiente una amplia variedad de sustancias, participan tanto en procesos de adquisición de nutrientes como en la excreción de toxinas.

Todas las bacterias expresan dos tipos de transportadores ABC, uno de tipo procariota (PK-type) y otro tipo eucariota (en las células eucariotas sólo encontramos transportadores EK-type). Los transportadores ABC de tipo procariota (PK-type) se caracterizan por necesitar proteínas extracelulares adicionales que se unen al sustrato, en las bacterias Gram-negativas éstas se denominan proteínas periplásmicas de unión (*Periplasmic Binding Proteins*, PBPs). La presencia de PBPs, en una u otra cara de la membrana, determina la dirección del transporte (Figura I.16). Las PBPs contienen dos dominios terminales (con cuatro o cinco laminas- β) conectados por α -hélices; estas dos regiones delimitan una hendidura que constituye el lugar de reconocimiento del hierro-sideróforo. La capacidad que muestran estas proteínas para unir y mediar el transporte de un amplio rango de sustancias, a menudo de estructura química muy diversa, se explica por la plasticidad de su sitio de unión (Figura I.17) (Rohrbach *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 2002). Tras la unión con el sustrato éste se transfiere al transportador de tipo ABC propiamente dicho.

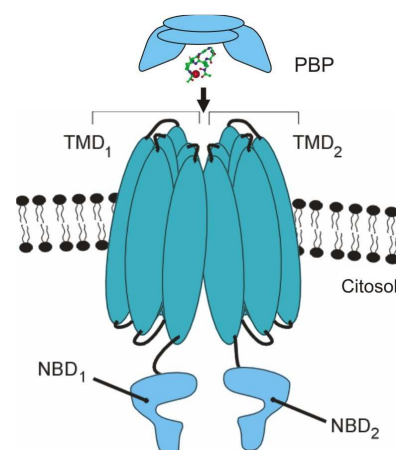


Figura I.16: Estructura de los transportadores de tipo ABC: Proteína periplásmica (PBP), dominios transmembrana (TMD) y dominio catalítico (NBD).

Estructuralmente los transportadores de tipo ABC se componen de dos dominios transmembrana (*Transmembrane Domain*, TMD) y dos de unión a nucleótidos (*Nucleotide Binding Domains*, NBDs) (Figura I.16) (Moussatova *et al.*, 2008). Los dominios TMDs se integran en la membrana plasmática y delimitan un canal con un número variable (8-20) de α -hélices. Los dominios NBDs comunes en todas las proteínas que unen ATP (Dassa & Bouige, 2001), son solubles en agua y se asocian con los dominios TMD en una de las caras de la membrana citoplasmática. Se encargan de la unión e hidrólisis de ATP proporcionando la energía necesaria para que se produzcan los cambios conformacionales en los TMDs y de este modo el transporte de la sustancia (Kerr, 2002).

En los PK-type cada dominio está codificado por un gen propio, necesitándose de dos a cuatro genes para formar el transportador final por oligomerización. Estos genes suelen

estar agrupados en los cromosomas formando operones cuya expresión controla un promotor único (Moussatova *et al.*, 2008).

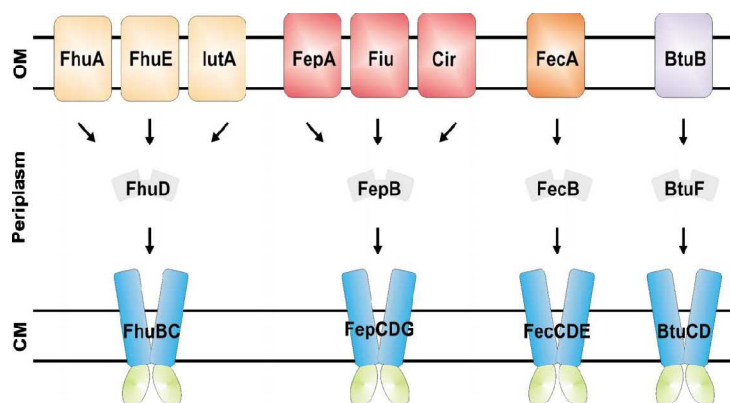


Figura I.17: Sistemas de transporte en *E. coli* K-12 (Ferguson & Deisenhofer, 2004). La menor especificidad de los transportadores de tipo ABC hace que a menudo un mismo transportador media la internalización de sustancias captadas por receptores de membrana externa diferentes. Los receptores de membrana externa representados son FhuA, IutA, y FhuE que transportan sideróforos de tipo hidroxamato; FepA, Cir, y Fiu, que transportan sideróforos de tipo catecol; FecA transporta sideróforos de tipo carboxilato como el ferricromo; y BtuB transporta vitamina B12.

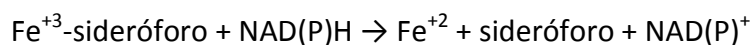
4.5 Utilización del hierro transportado por sideróforos

Una vez en el citoplasma el Fe^{+3} debe ser liberado del complejo hierro-sideróforo. De este modo, el metal se almacenará o bien se incorporará al metabolismo de la célula. La liberación del hierro permite también la reutilización del sideróforo, ya que una vez descargado, éste se secreta de nuevo al medio extracelular. Los mecanismos básicos para liberar el metal consisten en la reducción del ión (de Fe^{+3} a Fe^{+2}) mediante reductasas, o la hidrólisis del sideróforo.

4.5.1 Hierro-reductasas

Se han identificado reductasas en bacterias, hongos y levaduras: *Bacillus* spp. (Arceneaux & Byers, 1980), *Paracoccus* (*Micrococcus*) *denitrificans* (Tait, 1975), *E. coli* (Fischer *et al.*, 1990), *Pseudomonas aeruginosa* (Cox, 1980), *Legionella pneumophila* (Poch & Johnson, 1993), *Spirillum itersonii* (Dailey & Lascelles, 1977), *Mycobacterium smegmatis*

(Ratledge, 1971) y *Histoplasma capsulatum* (Timmerman & Woods, 2001). En todos los casos la reacción que catalizan es del tipo:



Así se permite la solubilización del hierro en el citoplasma pues los sideróforos tienen una baja afinidad por el ión Fe^{+2} (Figura I.18). De las descritas, sólo encontramos ejemplos de reductasas cuya expresión se regule por la concentración intracelular de hierro en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Dancis, 1998) y *Schizosaccharomyces pombe* (Roman *et al.*, 1993).

Los estudios de la actividad reductasa realizados en *V. anguillarum* y especies cercanas, como *V. vulnificus*, han evidenciado diferencias entre especies. En *V. anguillarum* se ha detectado actividad reductasa también asociada a la superficie celular, se han descrito diferencias entre serotipos en cuanto a la capacidad de reducir diferentes fuentes de hierro y detectado un aumento en su actividad dependiente de la concentración de hierro del medio (Mazoy & Lemos, 1996a). Sin embargo, en *V. vulnificus* se obtuvieron resultados dispares: los biotipos I y II expresan sistemas de captación de hierro diferentes pero la actividad reductasa es similar, se concentra en citoplasma y periplasma y no depende del contenido de hierro del medio (Mazoy *et al.*, 1999).

Con la utilización de reductasas purificadas se ha demostrado que éstas poseen amplios rangos de especificidad en cuanto a sustrato (Arceneaux & Byers, 1980; Fischer *et al.*, 1990). Por ejemplo, la reductasa de *E. coli* fue capaz de reducir todos los hierro-sideróforos ensayados con independencia de si eran o no utilizables por la bacteria (aerobactina, ferricromo, arthrobactina, schizokineno, otros hidroxamatos y análogos de la enterobactina como MECAM y MECAMS) (Fischer *et al.*, 1990). La proteína purificada tiene un peso molecular de 26 kDa y su actividad se ve estimulada por la riboflavina-5'-fosfato (FMN) que actúa como grupo prostético de muchas NADH deshidrogenasas.

El destino final del Fe^{+2} liberado es el almacenamiento en bacterioferritinas, la incorporación a los anillos de porfirinas por ferroquelatasas (Dailey & Lascelles, 1977) y/o su incorporación en apoproteínas. En el proceso de reducción podrían actuar, a modo de aceptores de Fe^{+2} , sustancias como el salicilato y el DHBA, lo que hace que la reacción de reducción desplace su equilibrio hacia la producción del ión Fe^{+2} (Figura I.18). Maximizar la

reacción de reducción es de suma importancia en los casos en que el sideróforo tiene potenciales redox muy negativos (incluso inferiores al del NAD(P)H). En estos casos la reacción catalizada por las reductasas no es termodinámicamente favorable, aunque procesos efectivos de retirada del Fe^{+2} la hacen posible (Ratledge & Winder, 1962; O'Brien & Gibson, 1970; Hancock *et al.*, 1977; Adilakshmi *et al.*, 2000).

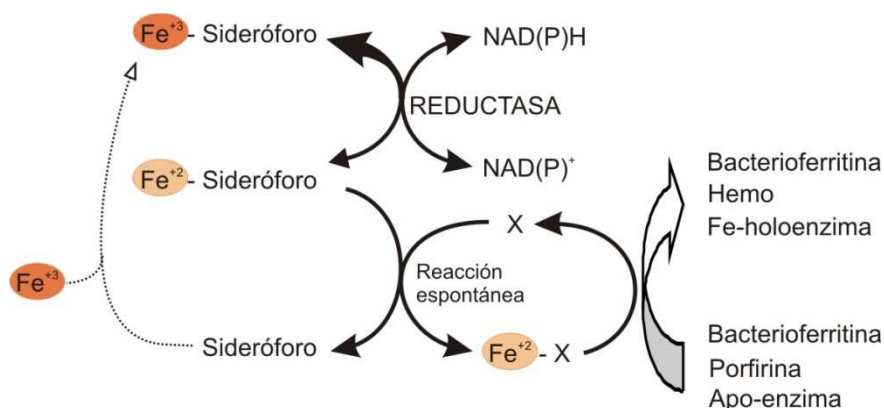


Figura I.18: Esquema de la liberación por reducción del hierro captado por sideróforos. Para que se produzca la reacción es necesaria la participación de un aceptor (X) que retire el hierro liberado (Fe^{+2}).

4.5.2 Esterasas de sideróforos

En muchos casos la liberación del ión Fe^{+3} no puede realizarse directamente por medio de reductasas pues los sideróforos pueden tener potenciales redox que superan en mucho al del NAD(P)H/NAD(P)⁺. Este es el caso de los sideróforos tridentados como la enterobactina que alcanza un potencial redox de -750 mV a pH 7 (el potencial redox del NAD(P)H/NAD(P)⁺ es de -324 mV). En estos casos actúan de modo secuencial una enzima que cataliza la degradación intracelular del sideróforo seguido de la acción de reductasas (Figura I.19). La degradación se efectúa por hidrólisis de los enlaces éster del sideróforo (Raymond *et al.*, 2003). Así la esterasa de hierro-enterobactina, Fes, es indispensable para la utilización del hierro captado mediante este sistema (Brickman & McIntosh, 1992; Lin *et al.*, 2005). Además, homólogos de Fes descritos en *Salmonella enterica* como IroD e IroE hidrolizan salmochelina, un análogo glicosilado de la enterobactina (Lin *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005). Mientras que otras como CbsH, descrita en *Erwinia chrysanthemi*, hidroliza chrisobactina pero, en este caso, no es esencial para la utilización del hierro (Rauscher *et al.*, 2002).

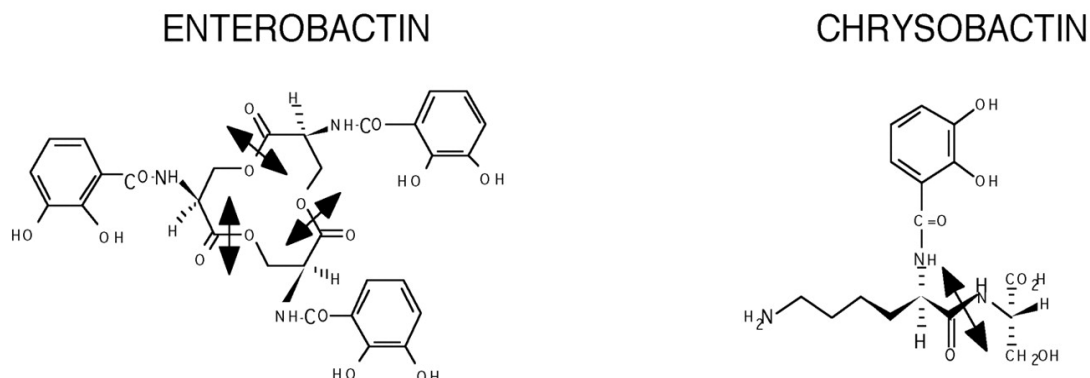


Figura I.19: Sitios de corte de las esterazas de enterobactina y chrysobactina (Furrer *et al.*, 2002; Rauscher *et al.*, 2002).

5. Aplicaciones del transporte de sideróforos

El aumento de la presión selectiva derivada de la utilización de antibióticos provoca la aparición de cepas resistentes o multi-resistentes llegando en la actualidad a ser un problema de primer orden. Esto hace que los esfuerzos encaminados al desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos sean prioritarios a la hora de tratar las enfermedades que afectan tanto a humanos como a animales. Los mecanismos de resistencia a antibióticos suelen ser modificaciones en el microorganismo que afectan a la permeabilidad de sus membranas, alteraciones en la diana del medicamento, inducción de enzimas de degradación o a la acción de bombas transportadoras.

Uno de los modos de aumentar la eficiencia y especificidad de un antibiótico es facilitar su internalización en la célula diana. Con este fin se ha diseñado la estrategia conocida como “*Caballo de Troya*” (Figura I.20), que consiste en unir un fármaco a un compuesto que la célula capte de forma activa, con el fin de aprovechar una vía de entrada natural para introducir el fármaco y con

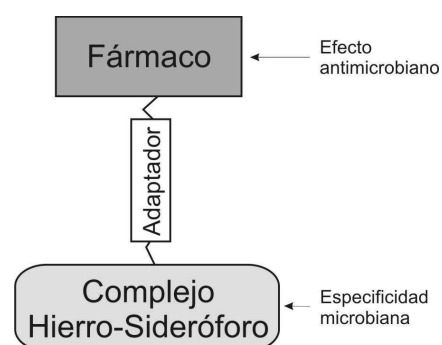


Figura I.20. Estructura potencial de un sideróforo conjugado con un antibiótico.

ello aumentar su especificidad y su eficiencia. En este sentido los sideróforos pueden ser vectores de transporte efectivos pues disponen de una maquinaria potente y específica perfectamente acoplada para su recuperación del medio extracelular (Miller *et al.*, 2009).

De forma natural son numerosas las sustancias que aprovechan los receptores de membrana implicados en el transporte de hierro: antibióticos como la albomicina (Ferguson *et al.*, 2000), fagos como el T5 (Heller & Schwarz, 1985; Plancon *et al.*, 2002) y bacteriocinas como las colicinas o microcinas (Braun *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 2002; Patzer *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2004) son ejemplo de ello.

Las microcinas son pequeños péptidos (≈ 100 aa) antibacterianos secretados por ciertas especies de enterobacterias considerados antibióticos de espectro reducido. Las microcinas entran en la célula diana a través de receptores relacionados con la captación de hierro. Recientemente se han caracterizado modificaciones post-traduccionales que producen un incremento en la sensibilidad de la célula diana. La cepa RYC492 de *Klebsiella pneumoniae* produce una microcina de 85 aa (MccE492), que puede sufrir una modificación post-traducciona que depende de la producción de enterobactina endógena y de los genes *mceABCDEFGHIJ*. La modificación consiste en la unión de la microcina MccE492 a un trímero de DHBA-Ser mediante una β -D-glucosa (Figura I.21), lo que hace que los receptores de sideróforos de tipo catecol FepA, Cir y Fiu sirvan como ruta de entrada, aumentando su eficiencia 6-8 veces (Thomas *et al.*, 2004; Destoumieux-Garzon *et al.*, 2006).

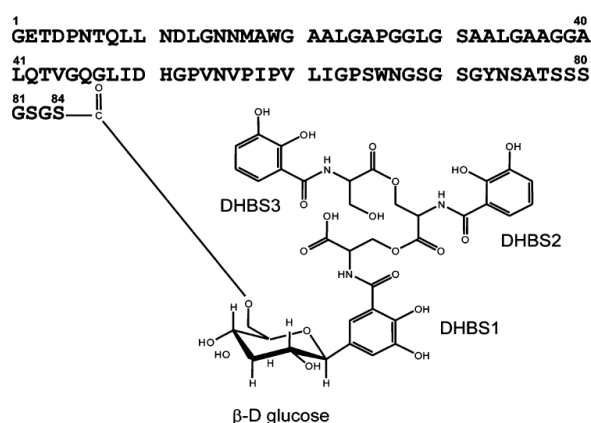


Figura I.21: Estructura de la microcina MccE492m. Consiste en la unión de la microcina MccE492 (84 aminoácidos) a un trímero lineal de DHBA-Serina (enterobactina linearizada) mediante una β -D-glucosa.

En la maduración de la MccE492 interviene: una C-glycosyltransferasa (MceC) homóloga a IroB; una esterasa que corta la enterobactina y produce trímeros de DHBA-Ser, función codificada por *mceD*; un gen homólogo a *iroD* y los genes *mceI* y *mceJ* (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2006). Los genes *iro* codifican funciones de síntesis y utilización de salmochelina que es un derivado glicosilado de la enterobactina (Crouch *et al.*, 2008). Esto evidencia las relaciones que existen entre los genes de síntesis de sideróforos y los procesos de maduración de microcinas.

Este tipo de modificación, consistente en producir un péptido-sideróforo, se produce en otras microcinas como MccJ25, MccM y MccH47, en las que al inactivar los genes de síntesis de enterobactina se observa un descenso significativo en la producción de este tipo de microcinas (Patzner *et al.*, 2003; Azpiroz & Lavina, 2007).

FhuA, receptor de membrana externa dependiente de TonB, reconoce y transporta sideróforos de tipo hidroxamato como el ferricromo, un hexapéptido cíclico compuesto por tres δ -N-acetil-L- δ -N-hidroxiornitina y tres residuos de glicina. Cualquier análogo estructural del ferricromo que conserve intacta la porción quelante de hierro es reconocido y transportado por FhuA. Por el contrario, la alteración estructural de la porción quelante de hierro produce la pérdida del reconocimiento específico del receptor. Esto hace que la albomicina, análogo estructural del ferricromo, sea un potente antibiótico contra *E. coli*, con una CMI de 5 ng/ml. FhuA es la vía de entrada del ferricromo y análogos como la albomicina, pero también sirve como transportador para otros compuestos que no poseen una estructura química relacionada con los hidroxamatos, este es el caso de ciertos fagos (T1, T5, ϕ 80 y UC-1), la microcina J25, la colicina M y la rifamicina CGP 4832. La rifamicina es un antibiótico que difunde a través de la membrana de forma pasiva, mientras que su derivado CGP 4832 se transporta activamente a través de FhuA. Estudios de cristalografía demostraron que la unión de CGP 4832 al receptor modifica el centro de unión de éste permitiendo su transporte. Aunque el transporte de esta sustancia es menos eficiente que el del ferricromo o sus análogos, y que no atraviesa la membrana interna a través del transportador de tipo ABC asociado a FhuA, el hecho de que atravesase la membrana externa mediante un transporte activo hace que su eficiencia aumente unas 200 veces respecto a la rifamicina original (Ferguson *et al.*, 2001).

6. La homeostasis del hierro: regulación génica

6.1 Mecanismo general de regulación transcripcional: la proteína Fur

La utilización de un potente sistema de captación de hierro mediado por sideróforos implica la necesaria existencia de un sistema de regulación capaz de adecuar la expresión de sus genes a los requerimientos fisiológicos. La regulación actúa sobre los procesos de biosíntesis y secreción del sideróforo, captación del complejo hierro-sideróforo, y también sobre la liberación y el almacenamiento del hierro.

En las bacterias, la regulación de la homeostasis del hierro se efectúa principalmente a nivel transcripcional por reguladores globales sensibles a la concentración de hierro intracelular. Los reguladores más importantes pertenecen a la familia de la proteína Fur (*Ferric uptake regulator*) o a la familia de la toxina de la difteria DtxR (Hantke, 2001). Mientras Fur es el regulador general en la mayoría de las bacteria Gram-negativas y en las Gram-positivas de bajo contenido en GC (e.j. *Bacillus* spp.), DtxR cumple funciones análogas en Gram-positivas con alto contenido GC como Streptomyces, Micobacterias y Corinebacterias. En las bacterias que utilizan Fur como regulador general de la homeostasis del hierro se utilizan proteínas de tipo DtxR para regular el transporte de manganeso.

La estructura de los dominios y centro de unión al hierro es similar en ambas familias de reguladores (Pohl *et al.*, 1998; 1999; 2003). El dominio C-terminal está implicado en la formación de homodímeros, alberga un sitio de unión a Zn^{+2} y un sitio regulador de unión a Fe^{+2} . En *E. coli* se ha comprobado que el Zn^{+2} participa en la dimerización, aunque este sitio no está muy conservado en la familia de ortólogos de Fur (Pecqueur *et al.*, 2006). El ión Fe^{+2} se une al centro regulador actuando como co-represor, de modo que Fur se ancla a sus sitios de unión en el DNA (Bagg & Neilands, 1987). El centro regulador que une Fe^{+2} está compuesto por cinco residuos de aminoácidos (dos His, dos Asp y una Glu) y una molécula de H_2O , lo que hace que la disposición del ligando sea en forma de octaedro.

Con la utilización de un fragmento del gen *fur* de *E. coli* como sonda, se rastreó la presencia de este gen en una genoteca de *V. anguillarum*, consiguiéndose aislar y caracterizar el gen que codifica esta proteína en esta especie. La secuencia de aminoácidos de la proteína Fur de *V. anguillarum* se corresponde con una proteína de 20 kDa con gran

homología a las proteínas Fur descritas en *V. cholerae* y *V. vulnificus*. El grado de homología es menor, aunque sigue siendo elevado, con la proteína Fur de *E. coli* y *Y. pestis*. Esta divergencia es más evidente en la región C-terminal que interviene en la unión con el hierro. Se comprobó la relación entre el gen caracterizado y la regulación dependiente de hierro mediante la utilización de una cepa *V. anguillarum fur⁻* (cepa 775met11) construida a tal efecto, cepa en la que se evidenció una total pérdida de regulación dependiente de hierro (Tolmasky *et al.*, 1994).

6.1.1 Mecanismo de acción de Fur

Fur fue el primer represor de los sistemas de transporte de hierro descrito en *E. coli* (Hantke, 1981). El modo general de acción consiste en la unión de una molécula de Fe^{+2} al monómero Fur. Cuando Fur está cargado con hierro se dimeriza y se une fuertemente a unas secuencias presentes en los promotores de ciertos genes que se denominan “cajas Fur”, de forma que impide la expresión de los mismos (Figura I.22). Suele tratarse de genes que intervienen de algún modo en la homeostasis del hierro, asegurándose así la cantidad suficiente del metal y evitando que su concentración llegue a ser tóxica. Aparte de actuar como represor, la acción de Fur cargado con Fe^{+2} puede tener otros efectos. Se han descrito casos en los que Fur promueve directa o indirectamente la expresión de determinados genes, por ejemplo el RNA α del plásmido pJM1 de *V. anguillarum* (Chen & Crosa, 1996).

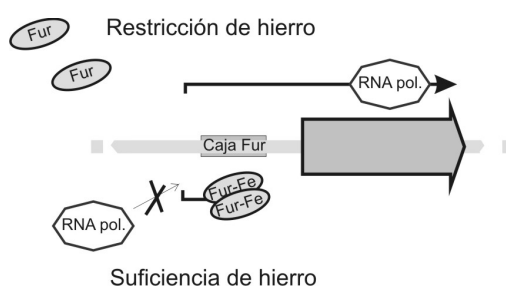


Figura I.22: Mecanismo general de represión por Fur.

Además del mecanismo general descrito, en *Helicobacter pylori* Fur se une también al DNA sin estar cargado de hierro (condiciones de déficit de hierro) reprimiendo genes implicados en el almacenamiento de hierro (Delany *et al.*, 2001). Por último, la proteína Irr de *B. japonicum* (proteína de la familia Fur) puede también anclarse a su secuencia diana sin

estar unida a hierro, promoviendo la expresión génica en unos casos y reprimiéndola en otros (Yang *et al.*, 2006).

6.1.2 La caja Fur

La proteína Fur se une al DNA en una región operadora conocida como caja Fur que se localiza entre las posiciones -10 y -35 de los promotores de genes regulados por hierro. Aunque existe controversia en cuanto a su estructura, se trata de una secuencia palindrómica de 19 pb (secuencia consenso de *E. coli* GATAATGATAATCATTATC) (de Lorenzo *et al.*, 1987). Aunque la secuencia de 19 pb es totalmente operativa (Calderwood & Mekalanos, 1988), es difícil explicar la tendencia de Fur a polimerizar sobre la doble hélice de



Figura I.23: Estructuras propuestas para la caja Fur. (A) Secuencia palindrómica de 19 pb. (B y C) Hexámero GATAAT en diferentes estructuras.

DNA. Para explicar esta cuestión se han sucedido diversos modelos: Unos ven la caja Fur como la repetición del hexámero GATAAT al menos tres veces, siguiendo la estructura 6-6-1-6, con la que interaccionan un mínimo de tres dímeros de Fur (Escolar *et al.*, 1998; 1999). El modelo de hexámeros podría estar también constituido por tres hexámeros consecutivos en la misma orientación (F-F-F) o dos en la misma orientación y el último invertido (F-F-R) (Lavrrar & McIntosh, 2003). Otros proponen que la caja Fur está formada por el mismo motivo (GATAAT) pero siguiendo una estructura (7-1-7)₂ basada en heptámeros superpuestos que forman una secuencia de 21 pb (Figura I.23) (Baichoo & Helmann, 2002).

Actualmente la caja Fur se define como al menos tres repeticiones adyacentes del hexámero NAT(A/T)AT. En un mismo promotor se pueden encontrar varias cajas Fur. Así el promotor del operón de la aerobactina de *E. coli* une Fur eficientemente en una región de unas 100 pb que contiene repeticiones degeneradas del hexámero GATAAT (Escolar *et al.*, 2000).

Recientemente se ha estimado la caja Fur consenso del género *Vibrio* a partir de los genomas disponibles en las bases de datos. La caja Fur consenso sería la secuencia de 19 pb 5'-AATGANAATNATTNTCATT-3'. En cada uno de los genomas analizados este motivo de

union a Fur se encuentra asociado a unos 50-61 genes y 16-20 operones (Ahmad *et al.*, 2008).

6.2 Otros procesos de regulación

En la regulación de la homeostasis del hierro, además de la regulación global por represión ejercida por Fur/DtxR, intervienen otros procesos de regulación transcripcional con un espectro de actuación más reducido. Generalmente estas piezas accesorias actúan como activadores y suelen ser sensibles directa o indirectamente a la presencia de hierro-sideróforo. Estos reguladores se pueden agrupar como: (1) factores sigma ECF (*extracytoplasmic function* (ECF) *sigma factor*), (2) sistemas de transducción de señal de dos componentes, (3) reguladores tipo AraC, (4) LysR y (5) regulación post-transcripcional. Habitualmente todos estos componentes de regulación específicos están a su vez regulados por Fur.

Factores sigma ECF: FecI de *E. coli* es un factor sigma ECF sensible a la concentración extra-citoplasmática de citrato férrico que activa la expresión de los genes responsables del transporte del citrato férrico (*fecABCDE*). La unión de citrato férrico a FecA activa la transducción de señal a través de la membrana externa, el extremo N-terminal de FecA contacta con el extremo C-terminal de FecR, proteína de la membrana citoplasmática que transduce la señal al interior celular y activa FecI. FecI promueve la unión de la RNA polimerasa al promotor de *fecABCDE* activando así la transcripción de estos genes (Enz *et al.*, 2000). Se han descrito sistemas homólogos en *Pseudomonas putida* y *P. aeruginosa* sensibles a los sideróforos pseudobactina y pioverdina respectivamente (Braun *et al.*, 2003b).

Sistemas de transducción de señal de dos componentes. Un ejemplo es el sistema PfeR-PfeS de *P. aeruginosa*, que es sensible a la hierro-enterobactina periplásmica y activa la expresión del receptor de enterobactina (PfeA) (Dean *et al.*, 1996).

Reguladores de la familia AraC. Los miembros de esta familia contienen dominios de unión al DNA tipo AraC y estructuralmente están compuestos por dos motivos Hélice-Vuelta-Hélice (HTH) y varios dominios de unión al efector, por ejemplo un hierro-sideróforo (Gallegos *et al.*, 1997). El efecto regulador se ejerce promoviendo la transcripción al

interaccionar directamente con la RNA polimerasa. Estos mecanismos son sensibles a la presencia de hierro-sideróforo intracelular asegurando una regulación fina tanto de la biosíntesis como de los genes de transporte y utilización. PchR de *P. aeruginosa*, el primer miembro descrito de esta clase de reguladores, induce en presencia de hierro-pioquelina la expresión de los genes de biosíntesis de pioquelina (*pchDCBA*) y su receptor (*ftpA*) (Michel *et al.*, 2005).

Reguladores de tipo LysR. Los reguladores transcripcionales de tipo LysR (Familia LTTRs) son los más abundantes en el reino procariota, controlando la expresión de genes implicados en una gran variedad de procesos celulares. Ejercen su función como activadores transcripcionales promoviendo la expresión de su gen diana en presencia de un coinductor a la vez que reprimen su propia expresión. Habitualmente ejercen su efecto regulador sobre genes adyacentes que se transcriben junto a ellos a partir de promotores divergentes (Figura I.24), aunque se han descrito ejemplos en los que sus genes diana se sitúan en zonas más alejadas. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener en el extremo N-terminal una estructura de unión a DNA Hélice-Vuelta-Hélice y en su extremo C-terminal un dominio de unión al coinductor (Schell, 1993).

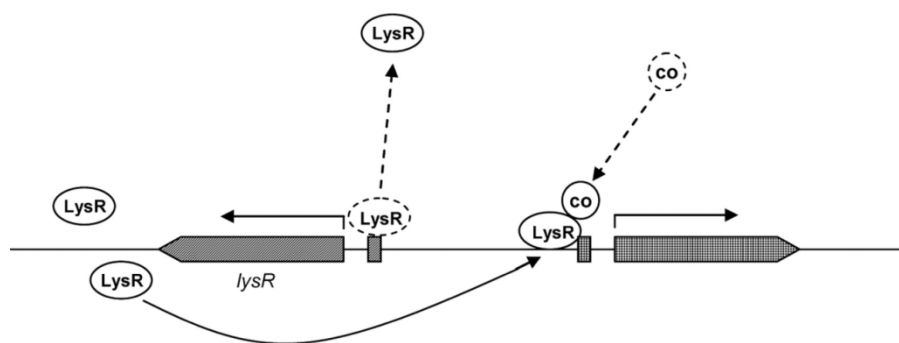


Figura I.24: Representación esquemática del modelo clásico de acción de los reguladores de la familia LysR (Maddocks & Oyston, 2008). El gen *lysR* sólo se expresa cuando su producto, LysR, se disocia de su propio promotor. Una vez unido al coinductor, se ancla a secuencias conservadas presentes en el promotor del gen diana promoviendo la expresión de éste.

Regulación post-transcripcional. Existen también procesos de regulación que actúan a nivel post-transcripcional que se basan en dos mecanismos básicos: existencia de RNA antisentido y proteínas que interaccionan con el RNAm. En numerosas bacterias, pequeños RNA antisentido se unen a sus RNAm diana promoviendo su degradación, estando

su expresión a menudo regulada por Fur. Ejemplos de estos mecanismos son RhyB de las enterobacterias (Masse *et al.*, 2003), PrrF1/PrrF2 de *P. aeruginosa* (Wilderman *et al.*, 2004), y los RNA α/β del plásmido de virulencia pJM1 de *V. anguillarum* del que hablaremos en el siguiente apartado (Crosa, 1997).

7. Mecanismos de asimilación de hierro basados en sideróforos en *V. anguillarum*

7.1 El plásmido pJM1 y el sistema de la anguibactina

En la mayoría de las cepas patógenas la capacidad de captar hierro del hospedador es esencial para el desarrollo de la infección. Crosa *et al.* (1977) revelaron que aquellas cepas de *V. anguillarum* clasificadas como altamente virulentas portaban plásmidos grandes con un tamaño aproximado de 50 MDa. Uno de ellos, denominado pJM1, codificaba un potente sistema de captación de hierro cuya pérdida o inactivación provocaba un descenso significativo de la patogenicidad (Crosa *et al.*, 1980; Wolf & Crosa, 1986). El plásmido pJM1 de 65 kb contiene los genes de síntesis y transporte del sideróforo de tipo catecol anguibactina (Figura I.25), y está presente en la mayoría de las cepas patógenas del serotipo O1 (Crosa *et al.*, 1980; Tolmasky *et al.*, 1985). Sin embargo existe cierta variabilidad entre los plásmidos considerados de tipo pJM1. Aunque todos muestran gran similitud entre ellos, confieren la capacidad de sintetizar anguibactina y exclusivamente las cepas que los portan expresan el receptor de membrana OM2 de 86 kDa, suele haber cierta variabilidad en su tamaño (Tolmasky *et al.*, 1985). Por ejemplo, el plásmido de tipo pJM1 denominado pEIB1 tiene un tamaño de 66 kb y se diferencia del resto de plásmidos de tipo pJM1 en la disposición de ciertos elementos móviles (Wu *et al.*, 2003).

7.1.1 Biosíntesis del sideróforo anguibactina

La síntesis de anguibactina se viene estudiando desde finales de los años 70; a pesar de ello todavía quedan numerosos interrogantes por aclarar. Es un sideróforo de tipo mixto cuya fórmula química se corresponde con C₁₅H₁₆N₄O₄S y un peso molecular de 348, está compuesto por DHBA-Cisteína-Histamina y posee dos grupos de unión a hierro, uno tipo

catecol y otro hidroxamato (Figura I.8) (Actis *et al.*, 1986). Gracias a que se trata de un sideróforo de estructura conocida, se ha elaborado una ruta de biosíntesis presuponiendo la participación de genes todavía sin caracterizar, pues el estudio de otros sideróforos de este tipo hace posible prever la participación de determinadas funciones (Figura I.25).

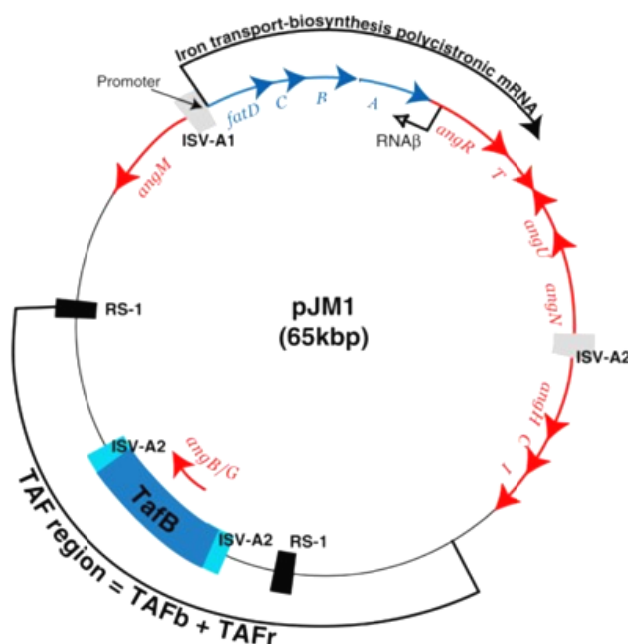


Figura I.25: Estructura del plásmido pJM1. Se representan mediante flechas los *orfs* relacionados con el sistema de síntesis (en rojo) y transporte (en azul) de la anguibactina (Crosa & Walsh, 2002).

En el modelo actual de síntesis de anguibactina (Figura I.26) se considera que en la conversión de corismato en DHBA participan homólogos cromosómicos de *entA*, *B* y *C* de *E. coli* pues, aunque numerosas cepas virulentas tienen en el plásmido un gen *angB/G* para la conversión de isocorismato en 2,3-dihidro-3,3-DHBA, el plásmido carece del resto de genes, o de estar presentes son pseudogenes. AngE, enzima no caracterizada hasta el momento, activa el DHBA recién sintetizado y lo carga en el grupo 4'fosfopanteteinil del dominio ArCP de AngG. Dependiendo de la cepa, el dominio ArCP se transcribe en un *orf* propio, como *angG*, o se puede transcribir junto a *angB* formando un único gen (*angB/G*) (Welch *et al.*, 2000). AngR activa una cisteína y AngM cataliza la unión entre DHBA y cisteína generándose un dipéptido DHBA-cisteína. AngN es la encargada de ciclar la cisteína para formar un anillo de tiazolina, mientras AngA y AngU modifican una histidina para formar N-hidroxi-histamina (Tolmasky & Crosa, 1995). Finalmente se produce un ataque nucleofílico de la N-hidroxi-

histamina a la DHBA-cisteína anclada al dominio PCP de AngM y se libera la anguibactina final (DHBA-Cisteína-Histamina) (Crosa & Walsh, 2002). En el proceso de liberación podría intervenir AngT, la única tioesterasa identificada del sistema, si bien cuando esta proteína no está presente sigue produciéndose cierta cantidad de anguibactina (Wertheimer *et al.*, 1999).

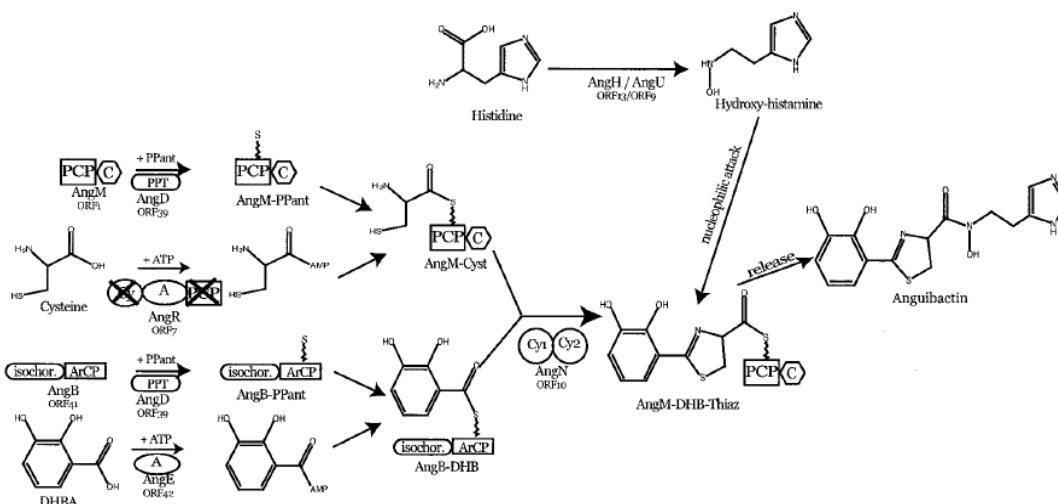


Figura I.26: Modelo de síntesis de anguibactina. Se muestra las proteínas que participan junto a sus estructuras de dominios (Di Lorenzo *et al.*, 2003).

7.1.2 Transporte de anguibactina

La captación de la hierro-anguibactina se realiza a través de un sistema específico de transporte (Tolmasky *et al.*, 1988). Este sistema está compuesto por el receptor de membrana externa FatA, una proteína de 86 kDa, que une hierro-anguibactina y la transporta hasta el periplasma (Crosa & Hodges, 1981). Esta fase del transporte es dependiente de la energía suministrada por el sistema TonB2 (Stork *et al.*, 2004).

El siguiente paso es atravesar la membrana celular, FatB, C y D forman el transportador de tipo ABC necesario para que el hierro-sideróforo pase desde el periplasma al citoplasma. La anguibactina se une a la proteína periplásmica FatB (Actis *et al.*, 1995), tras esta unión FatC y FatD catalizan el proceso de internalización (Koster *et al.*, 1991). Es importante destacar que los genes *fatA*, *B*, *C* y *D* forman junto a los genes de biosíntesis *angR* y *angT* un operón denominado ITBO (*Iron Transport and Biosynthesis Operon*) (figura I.25 y I.27).

7.1.3 Regulación

La anguibactina sólo se produce bajo condiciones de déficit de hierro al igual que los transportadores FatA y FatB, aunque éstos tienen una regulación más compleja (Tolmasky & Crosa, 1991; Crosa, 1997). La regulación se ejerce mayoritariamente por represión mediante el regulador general cromosómico Fur y por los RNAs antisentido RNA α y RNA β codificados en el plásmido. También intervienen procesos de activación mediados por AngR y la región TAF, ambos presentes en el plásmido pJM1 (Chen & Crosa, 1996). Además se ha constatado cómo la propia anguibactina promueve la expresión de genes relacionados con su transporte y biosíntesis.

Cuando la concentración de hierro aumenta, Fur reprime la expresión de todo el sistema de tal manera que en un mutante Fur⁻ la expresión de los genes del sistema de la anguibactina se vuelve constitutiva (Tolmasky *et al.*, 1994). Sin embargo, en presencia de hierro Fur tiene un efecto activador sobre la producción de RNA α , que interviene junto a Fur en la represión del operón ITBO (Figura I.27) (Chen & Crosa, 1996).

Cuando se comparan los niveles de expresión de los genes de transporte (*fat*) y los de síntesis, *angR* y *T*, contenidos en el operon ITBO, se observa una proporción de 50 a 1. Esta diferencia se debe a la acción del RNA antisentido β (RNA β) que se une a la región intergénica *fatA-angR* provocando la terminación prematura de la transcripción en este punto (Stork *et al.*, 2007a) (Figura I.27).

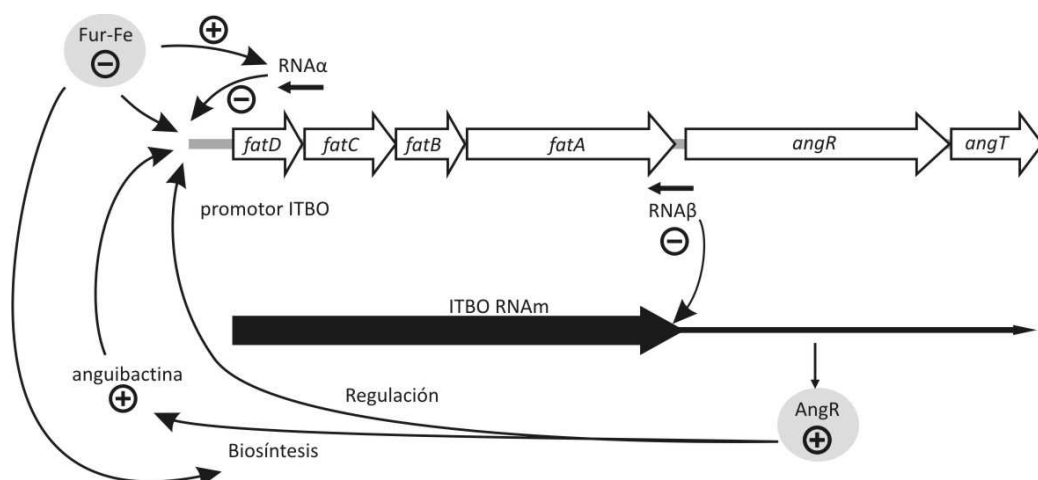


Figura I.27: Factores de regulación que intervienen en la regulación del operón ITBO, que codifica el sistema de biosíntesis y transporte de anguibactina (Stork *et al.*, 2002).

Por otro lado, AngR desempeña un papel determinante tanto en la biosíntesis como en la regulación al ser uno de los activadores necesarios para alcanzar niveles altos de expresión tanto de genes de transporte como de síntesis (Crosa, 1997). Un *V. anguillarum* *angR*⁻ muestra unos niveles de expresión tanto del operón ITBO como de *angM* y *angN* significativamente bajos. Otro factor determinante en la producción de anguibactina es la región TAFr, una región no muy bien acotada que contiene dos zonas que se postulan como dianas de unión de AngR (Chen & Crosa, 1996).

7.2 Existencia de un sideróforo alternativo en las cepas de *V. anguillarum* carentes del plásmido pJM1

Como se describe en el apartado anterior, el primer sistema de captación de hierro mediado por sideróforos descrito en *V. anguillarum*, y sin duda el más estudiado, es la anguibactina, sideróforo de tipo catecol producido exclusivamente por cepas del serotipo O1 que portan el plásmido pJM1. Aunque el plásmido codifica tanto genes de síntesis como de transporte, en el modelo de la anguibactina se considera que participan genes cromosómicos en la síntesis y activación del DHBA, centro funcional de los catecoles (Crosa & Walsh, 2002; Stork *et al.*, 2002). Sin embargo se han aislado cepas altamente virulentas del serotipo O1 y del O2 que, sin portar plásmidos grandes del tipo pJM1, producen un sideróforo distinto a la anguibactina que se denominó vancrobactina. Las cepas productoras de vancrobactina, y no las que producen anguibactina, promueven el crecimiento de la cepa H775-3 curada del pJM1; de la cepa 775::Tn1-5, que posee el receptor de anguibactina inactivado, y de la cepa *enb-1* de *Salmonella enterica* que sólo utiliza enterobactina como fuente de hierro. Además, tienen un patrón de proteínas de membrana externa reguladas por hierro iguales entre sí y totalmente diferente al de las cepas productoras de anguibactina. La capacidad de producir sideróforos no está restringida a cepas de los serotipos O1 y O2, también se han descrito cepas del serotipo O3 que producen un sideróforo de tipo catecol, aunque en este caso existe cierta heterogeneidad (Muiño *et al.*, 2001). Por tanto, la vancrobactina es un sideróforo nuevo de tipo catecol de estructura desconocida, codificado por genes cromosómicos y con actividad biológica estrechamente relacionada con la enterobactina de *E. coli*. Por todo lo expuesto, la vancrobactina constituye

un sistema de captación de hierro cromosómico completamente independiente del sistema plasmídico (Lemos *et al.*, 1988; Conchas *et al.*, 1991). El objeto central de esta tesis será caracterizar este nuevo sideróforo e identificar los genes implicados en su síntesis, transporte, regulación y utilización.

II. Objetivos

Objetivos:

En la realización de este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

- (1) Caracterizar los genes que codifican el sistema de asimilación de hierro mediante el sideróforo de tipo catecol vancrobactina y describir la ruta de biosíntesis y transporte.
- (2) Determinar la estructura química de la vancrobactina.
- (3) Evaluar la utilidad del mecanismo de transporte de hierro-vancrobactina como ruta de entrada para nuevos antimicrobianos desarrollados mediante la estrategia del “Caballo de Troya”.

III. Material y Métodos

1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo, así como sus derivados, se muestran en la Tabla III.1. En general los vibrios se cultivaron en el medio agar/caldo de soja triptona de Difco a 25 °C suplementado con 1% de NaCl (TSA-1 y TSB-1 respectivamente). Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Lurina Bertani (LB) (Pronadisa) suplementado con el antibiótico adecuado. Tanto las cepas utilizadas como sus derivados se conservaron a -80 °C en LB líquido con un 20% de glicerol.

En las pruebas de crecimiento se utilizó el medio mínimo CM9 con la siguiente composición (Lemos *et al.*, 1988): Sales M9 ($\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 6 g/l; KPO_4H_2 3 g/l; NaCl 5 g/l; NH_4Cl 10 mg/l); glucosa 0,25%; casaminoácidos 0,2%; CaCl_2 0,01 mM y MgSO_4 0,1 mM.

Los antibióticos se utilizaron a unas concentraciones finales de: Ampicilina (Amp) 50 µg/ml (disolución stock 50 mg/ml en agua); Kanamicina (Kan) 50 µg/ml (disolución stock 50 mg/ml en agua); Gentamicina (Gm) 10 µg/ml (disolución stock 10 mg/ml en agua); Rifampicina (Rif) 50 µg/ml (disolución stock 25 mg/ml en DMSO). Las disoluciones de antibióticos se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros de 0,2 µm y se guardaron a -20 °C.

De forma clásica, en el estudio de la producción de sideróforos producidos por *V. anguillarum*, se ha utilizado como cepa modelo la cepa 775 (serotipo O1). Para la realización de este trabajo se ha seleccionado, de entre las cepas productoras de vancrobactina, la cepa RV22 como cepa modelo (serotipo O2). Esta cepa fue aislada de un brote de vibriosis que afectó a finales de los años 80 a rodaballos de la Ría de Vigo (Lemos *et al.*, 1988).

Tabla III. 1: Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa/Plásmido	Característica(s) relevante(s)	Referencia
<i>V. anguillarum</i>		
RV22	Serotipo O2, cepa aislada de rodaballo enfermo (España)	(Toranzo <i>et al.</i> , 1987) (Lemos <i>et al.</i> , 1988)
775met11	Serotipo O1, cepa defectiva en la proteína Fur	(Tolmasky <i>et al.</i> , 1994)
MB3	RV22 $\Delta vabE$	Este trabajo
MB6	RV22 $\Delta vabS$	Este trabajo
MB10	RV22 $\Delta vabC$	Este trabajo
MB11	RV22 $\Delta vabB$	Este trabajo
MB12	RV22 $\Delta vabA$	Este trabajo
MB14	RV22 $\Delta vabF$	Este trabajo
MB19	RV22 $\Delta vabH$	Este trabajo
MB53	RV22 $\Delta vabR$	Este trabajo
MB54	RV22 $\Delta vabG$	Este trabajo
MB67	RV22 $\Delta vabD$	Este trabajo
MB70	RV22 $\Delta orf13$	Este trabajo
MB84	RV22 $\Delta fvtA$	Este trabajo
MB90	RV22 $\Delta fvtA \Delta orf13$	Este trabajo
MB102	RV22 $\Delta vabB \Delta fvtA$	Este trabajo
MB104	RV22 $\Delta vabB \Delta orf13$	Este trabajo
MB107	RV22 $\Delta vabB \Delta fvtA \Delta orf13$	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE4 $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZAM15$) hsd R17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Colección del laboratorio
S17-1- λ pir	<i>recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir, Tp^R Sm^R</i>	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
XL1-Blue MR	$\Delta(mcrA)183\Delta(mcrCB-hsdSmr-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$	Stratagene
H1717	<i>araD139 rpsL150 D(argF-lac) relA1 U169 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR aroB fhuF : : λplacMu</i>	(Hantke, 1987)
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>		
<i>enb</i> -1	Mutante de biosíntesis de enterobactina, utiliza enterobactina como fuente de hierro	(Pollack <i>et al.</i> , 1970)
<i>enb</i> -7	Mutante de biosíntesis de enterobactina, utiliza enterobactina y DHBA como fuente de hierro	(Pollack <i>et al.</i> , 1970)
Plásmidos		
pGEM-T Easy	Vector de clonación de productos de PCR, Amp ^R	Promega
pT7-7	Vector de clonación, Amp ^R	(Tabor & Richardson, 1985)
pWKS30	Vector de clonación de bajo n° de copia, Amp ^R	(Wang & Kushner, 1991)
pNidKan	Plásmido suicida, derivado de pCVD442, <i>pir</i> , Kan ^R	(Mouriño <i>et al.</i> , 2004)
pHRP309	Vector de clonación de bajo n° de copia, Gm ^R	(Parales & Harwood, 1993)
SuperCos1	Vector cosmídico, Ap ^R , Neo ^R	Stratagene
MBcos69	Cósmido que contiene <i>vabD</i>	Este trabajo
MBcos167	Cósmido que contiene <i>orf13</i>	Este trabajo
pMB11	pHRP309 con la fusión <i>fvtA::lacZ</i>	Este trabajo
pMB12	pHRP309 con la fusión <i>vabH::lacZ</i>	Este trabajo
pMB13	Gen y promotor de <i>vabA</i> clonado en pHRP309, Gm ^R	Este trabajo
pMB14	Gen y promotor de <i>vabC</i> clonado en pHRP309, Gm ^R	Este trabajo
pMB15	Gen y promotor de <i>vabF</i> clonado en pHRP309, Gm ^R	Este trabajo
pMB16	Gen y promotor de <i>vabH</i> clonado en pHRP309, Gm ^R	Este trabajo
pMB19	pHRP309 con la fusión <i>vabA::lacZ</i>	Este trabajo
pMB20	pHRP309 con la fusión <i>vabC::lacZ</i>	Este trabajo
pMB33	pHRP309 con la fusión <i>vabG::lacZ</i>	Este trabajo
pMB34	pHRP309 con la fusión <i>vabR::lacZ</i>	Este trabajo
pMB54	Gen y promotor de <i>fvtA</i> clonado en pHRP309, Gm ^R	Este trabajo

2. Purificación de DNA

Los protocolos básicos de manipulación de DNA se realizaron como se describen en Sambrook & Russell (2001). Las extracciones de DNA genómico se efectuaron con el Easy-DNA kit (Invitrogen); para la purificación rutinaria de cósmidos, plásmidos y limpieza de restricciones y productos de PCR se utilizaron kits de Qiagen: *QIAfilter™ Plasmid Midi Kit*, *QIAprep® Spin Miniprep Kit*, *QIAquick® PCR Purification Kit* y *QIAquick® Gel Extraction Kit*.

3. PCR y PCR Inversa (I-PCR)

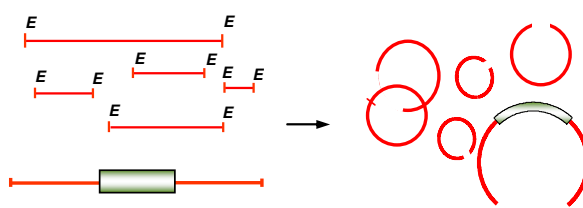
Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 1 U de Taq polimerasa (BioTaq, Bioline) 200 μ M de cada dNTP y una concentración final de 2 mM de $MgCl_2$. Dependiendo de la T_m de cada pareja de cebadores, las temperaturas de hibridación oscilaron entre 55 y 60 °C. Los tiempos de elongación utilizados se seleccionaron en función del tamaño esperado del amplicón (1 min kb^{-1}).

Al contrario de una PCR convencional, en la PCR inversa (I-PCR) los cebadores que flanquean la región conocida están orientados hacia los extremos de dicha región (figura III.1). La amplificación se realiza sobre una autoligación obtenida al digerir una extracción de DNA genómico con una enzima de restricción determinada y proceder a realizar, con el producto de la digestión, una reacción de ligación. De este modo, si la diana de restricción, que no puede cortar en la región conocida, corta a una distancia apropiada, podemos amplificar por PCR las regiones que flanquean la región conocida de partida para después secuenciarlas y avanzar en la obtención de secuencias. En las reacciones de I-PCR se utilizó *Expand Long Template PCR* de Roche según las instrucciones del fabricante. Al no conocer de antemano el tamaño del producto de PCR, se utilizó el tampón suministrado por el kit nº 2, que está optimizado para amplificar tamaños de hasta 12 kb. En la preparación del molde se procedió del siguiente modo: las reacciones de digestión contenían aproximadamente 2 μ g de DNA genómico y 1 U de enzima en un volumen final de 50 μ l, que se incubaron un mínimo de 6 h a la temperatura óptima. Las reacciones se limpiaron con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) para eliminar los restos de enzima y tampón, y se resuspendieron en

25 µl de H₂O. Se utilizaron estos 25 µl de cada una de las reacciones de digestión como molde para la reacción de autoligación con 1 U de T4-DNA ligasa (Fermentas); 5 µl de tampón de reacción; 5 µl de PEG 4000 al 50% y agua hasta un volumen final de 50 µl. La reacción se incubó a 4 °C durante toda la noche y se inactivó a 65 °C durante 10 min. Finalmente se utilizaron entre 2 y 3 µl de DNA religado como molde para la reacción de I-PCR.

En todos los casos se incluyeron controles negativos para garantizar la ausencia de DNA en los componentes de PCR utilizados y, cuando fue posible, se incluyeron también controles positivos para asegurar que las condiciones empleadas eran las adecuadas y descartar falsos negativos. Todas las reacciones de amplificación descritas en este estudio se realizaron en un termociclador *T-Gradient* (Biometra).

Paso 1. Digestión del DNA genómico con un enzima de restricción y autoligación del DNA digerido.



Paso 2. El DNA religado se utiliza como molde para una reacción de amplificación por PCR, con cebadores diseñados a partir de los extremos de la secuencia conocida

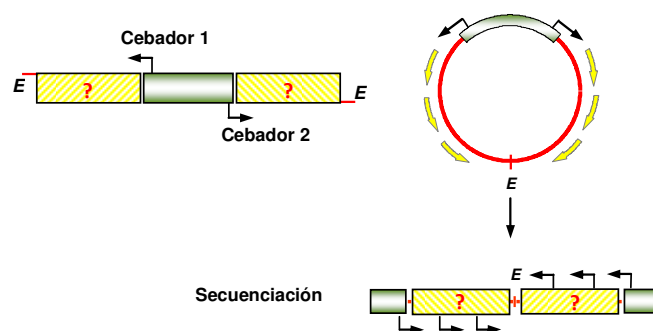


Figura III.1: Esquema de la PCR-Inversa utilizada para amplificar y secuenciar las regiones adyacentes a una secuencia previamente caracterizada. Tras el corte del DNA genómico con un enzima de restricción (*E*), los fragmentos obtenidos se autoligaron y sirvieron como molde en una reacción de amplificación con cebadores orientados hacia los extremos 5' y 3'. Como resultado final, se obtiene un fragmento de DNA delimitado por la secuencia de partida, a partir de la cual se puede secuenciar en ambas direcciones hasta localizar la diana de restricción *E*.

4. Clonación de fragmentos de DNA

Para las reacciones de clonación se utilizaron fragmentos de DNA de dos tipos: (i) productos de PCR y (ii) fragmentos derivados de la digestión con enzimas de restricción. Para clonar productos de PCR se utilizó el *pGEM-T-Easy Vector System* (Promega) (Figura III.2). Previamente a su clonación, las reacciones de PCR se limpiaron con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) o bien, en el caso de obtener múltiples fragmentos de amplificación, los fragmentos de interés se purificaron con el *QIAquick Gel extraction kit* (Qiagen) tras su separación electroforética en geles de agarosa. La relación molar inserto/vector utilizada en la reacción de ligación fue 3:1, con 1 U del enzima T4-DNA ligasa incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Las reacciones se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Las colonias positivas para la reacción de clonación se seleccionaron a partir de placas de LB con Ampicilina (50 μ g/ml), IPTG (0,5 mM) y X-gal (40 μ g/ml). Las colonias de coloración blanca se reaislaron para su confirmación. Se purificó el plásmido y, tras su digestión con *EcoRI*, el tamaño del fragmento clonado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

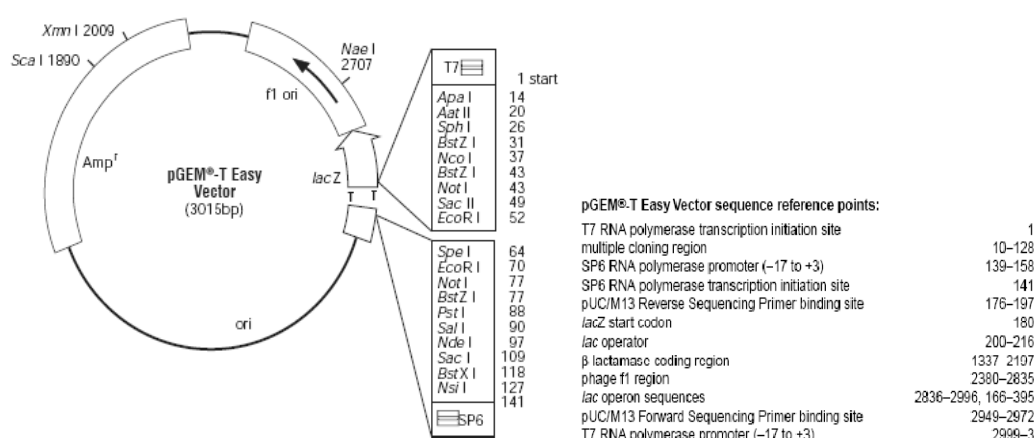


Figura III.2: Mapa del plásmido pGEM-T-Easy (Promega). Este vector está diseñado para la clonación de productos de PCR.

En la clonación de fragmentos de DNA no obtenidos por PCR se siguió la misma relación inserto/vector especificada para el caso anterior. Las reacciones de ligación se diseñaron para un volumen final de 20 µl con 1 U de T4-DNA ligasa y 2 µl de tampón de reacción 10X (Fermentas). En el caso de fragmentos con extremos romos, las reacciones se diseñaron para un volumen final de 20 µl con 1 U de T4-DNA ligasa (Fermentas), 2 µl tampón de reacción 10X (Fermentas) y 2 µl de PEG 4000 al 50%. En cualquier caso, todas las reacciones se incubaron a 4 °C durante toda la noche y se inactivaron a 65 °C durante 10 min previamente a su introducción en la cepa de *E. coli* correspondiente. Los clones recombinantes se seleccionaron en base al marcador de resistencia codificado por el vector (Figura III.3) y se confirmaron por digestión con endonucleasas de restricción y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

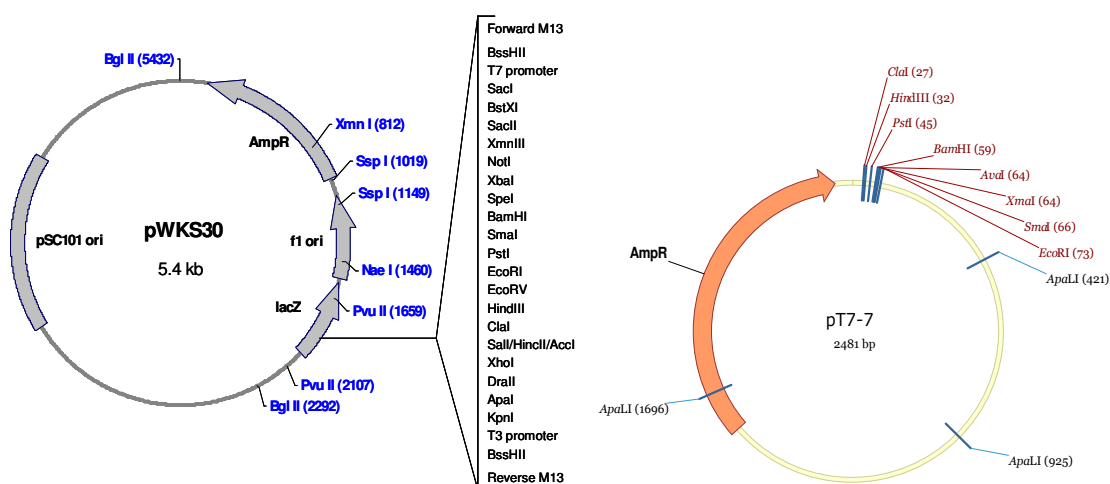


Figura III.3: Mapa de restricción de los principales vectores de clonación utilizados en este trabajo. Todos ellos se caracterizan por llevar genes que confieren resistencia específica a uno o más antibióticos, de modo que los clones recombinantes puedan ser fácilmente aislados a partir de su siembra en medios selectivos.

5. Transformación de plásmidos en *E. coli*

Transformación por choque térmico: Previamente al proceso de transformación, las células se hicieron “competentes” a la incorporación de DNA exógeno según el siguiente protocolo (Sambrook & Rusell, 2001): a partir de una colonia aislada de la cepa de *E. coli*

correspondiente, se inoculó 1 ml de medio LB que se incubó a 37 °C durante toda la noche. A continuación, se utilizaron 500 µl de este cultivo para inocular 50 ml de medio nuevo que se incubó hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) entre 0,3 y 0,4. Las células se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm/10 min (4 °C) y se resuspendieron en 10 ml de $CaCl_2$ 0,1 M manteniéndolas en hielo. Tras incubar en frío durante 30 min se centrifugó a 4.000 rpm /10 min. Finalmente el precipitado se resuspendió en 750 µl de $CaCl_2$ 0,1 M y 750 µl de glicerol al 50%. La suspensión final se repartió en alícuotas de 100 µl que se guardaron a -80 °C.

Para la transformación se mezclaron 10-20 ng de DNA plasmídico con 100 µl de células competentes y se mantuvo en hielo durante 30 min. A continuación, para aumentar la eficiencia del proceso, la mezcla se incubó a 42 °C durante 1 min e inmediatamente se transfirió a hielo en donde se mantuvo otros 2 min. Por último se añadió 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación. La selección de las colonias recombinantes se hizo mediante siembra en placas de LB suplementadas con los antibióticos apropiados según la resistencia conferida por el plásmido.

Electroporación: Para la obtención de células electrocompetentes se partió de 500 ml de un cultivo de la cepa de *E. coli* en medio LB, incubado a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} entre 0,2 y 0,4. Tras centrifugar a 5.000 rpm/10 min (4 °C), las células se resuspendieron, en dos ocasiones, en 100 ml de agua ultrapura (*Milli-Q*, Millipore) estéril y previamente enfriada en hielo. Tras una nueva centrifugación, el sedimento se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10%. Finalmente, esta suspensión se centrifugó a 5.000 rpm/10 min (4 °C) y las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10%. La suspensión final se repartió en alícuotas de 40 µl que se guardaron a -80 °C.

La transformación de la cepa de *E. coli* con DNA exógeno se llevó a cabo en un electroporador *Gene Pulser* (Bio-Rad) estableciendo los siguientes parámetros: 2,5 kV de voltaje, la resistencia a 200, 25 µF de capacitancia en un pulso de 5 ms de duración.

Por último se añadió 1 ml de medio LB y se incubó en agitación durante 1 h a 37 °C. La selección de las colonias recombinantes se hizo mediante siembra en placas de LB suplementadas con los antibióticos apropiados según la resistencia conferida por el plásmido.

6. Secuenciación y herramientas de bioinformática

El método de secuenciación empleado en el presente trabajo fue el de terminación de cadena o dideoxi utilizando para ello el kit comercial *GenomeLab DTCS quick start kit* y un secuenciador CEQ 8000 DNA (Beckman Coulter). Tanto las reacciones de secuenciación como la limpieza de las mismas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. El molde utilizado en las reacciones fueron plásmidos, cósmidos o productos de PCR. En este último caso para eliminar los restos de cebadores, nucleótidos y sales, los productos de amplificación se purificaron con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) o con el *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen) si se purificaban bandas recortadas de geles de agarosa.

Para el análisis de las secuencias obtenidas, mapas de restricción y detección de posibles genes (ORFs) se emplearon los programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) y Vector NTI versión 10.3.0 (Invitrogen). Para el análisis de homologías, tanto de secuencia de nucleótidos como de aminoácidos, se utilizaron los algoritmos FASTA3 y BLAST de las bases de datos EMBL y NCBI respectivamente. Para el análisis de dominios proteicos conservados se consultó la base de datos PFam del instituto Sanger (*Protein families database of alignments and HMMs* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)) (Bateman *et al.*, 2004). La aplicación *Virtual Footprint Promoter Matches* de la base de datos PRODORIC Release 8.1 (<http://prodoric.tu-bs.de/>) se utilizó para identificar posibles regiones operadoras. Para la localización de estructuras secundarias en los RNA mensajeros se utilizó MFOLD (3.1.2) (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>). Por último para la predicción de motivos transmembrana en la secuencia de aminoácidos se empleó el programa HMMTOP version 2.0 (Tusnady & Simon, 2001).

El número de acceso EMBL para la secuencia de *V. anguillarum* descrita en el presente trabajo es AM168450.

7. Reconstrucción filogenética de los dominios de adenilación

De las bases de datos UniProt/TrEMBL/Swiss-Prot, se recopilieron un total de 410 secuencias de aminoácidos de dominios de adenilación (Boeckmann *et al.*, 2003; Apweiler *et al.*, 2004). Usando el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), las secuencias se alinearon junto a los dominios de adenilación presentes en VabE y VabF. El alineamiento obtenido se visualizó y, cuando fue necesario, se ajustó manualmente. La reconstrucción filogenética se realizó con la región comprendida entre las posiciones 190-331, que constituye el sitio de unión a ligando (*substrate binding pocket*) (Stachelhaus *et al.*, 1999), gracias a los módulos SEQBOOT, PROTDIST, NEIGHBOR y CONSENSE del paquete PHYLIP 4.0 (Felsenstein, 1996). Para calcular el soporte estadístico de las ramas, se realizaron 1000 réplicas utilizando el método de aleatorización Bootstrap. El árbol obtenido con las 410 secuencias iniciales, se utilizó para seleccionar 56 secuencias de aminoácidos que se agrupaban junto a nuestras secuencias de trabajo y de las que obtuvimos información del sustrato que utilizaban. Estas secuencias se utilizaron en una segunda reconstrucción para elaborar el árbol final mostrado en este trabajo utilizando el mismo procedimiento.

8. Clonaje y secuenciación del *cluster* de genes de la vancrobactina

Con el objetivo de clonar los genes de síntesis de la vancrobactina, se probó mediante PCR la presencia, en la cepa RV22, del homólogo de *angE* descrito originalmente en el cromosoma de la cepa del serotipo O1, 90-11-287 (Holmstrom & Gram, 2003). Como resultado se obtuvo un amplicón cuya secuencia mostró un 97% de identidad con *angE*. Posteriormente, este producto de amplificación se utilizó a modo de sonda, en un experimento de hibridación, sobre digestiones totales de DNA genómico de RV22 utilizando diferentes enzimas. El resultado de este experimento mostró que, al utilizar *HindIII*, el homólogo de *angE* estaba contenido en un fragmento de aprox. 8 kb. Se migró de nuevo DNA cromosómico cortado con *HindIII* en un gel de agarosa al 1% y se cortó el fragmento comprendido entre 7-9 kb, que se utilizó como molde para una reacción de PCR inversa. Finalmente se obtuvo un fragmento de 7 kb que contenía genes homólogos a sistemas de

síntesis de catecoles. Mediante sucesivas PCRs inversas, en ambos sentidos, y diseño de cebadores conseguimos secuenciar una región de 18 kb que contiene gran parte del sistema de genes *vab*.

9. Obtención de una genoteca de cósmidos de la cepa RV22

Para la obtención de la genoteca de cósmidos se partió de una extracción de DNA genómico de la cepa RV22 realizado con *G NOME®DNA KIT* de Q•BIOgene siguiendo las indicaciones del fabricante, lo que asegura que el DNA de partida no esté fragmentado. Posteriormente se realizó una digestión parcial de 5 µg de DNA con 0,1 U de *Sau3AI* en un volumen total de 100 µl.

Tras 4 min de digestión se paró la reacción con 15 µl de EDTA a 0,5 M. Con este protocolo de digestión obtuvimos fragmentos de DNA de tamaños superiores a 25 kb. Finalmente, la muestra de DNA parcialmente digerido se trató con fosfatasa alcalina (Fermentas) (Figura III.4).

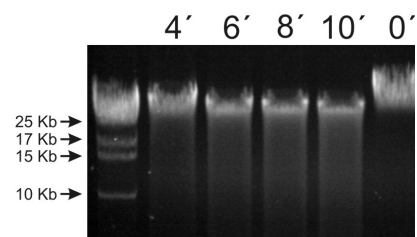


Figura III.4: DNA genómico de la cepa RV22 digerido con *Sau3AI*. Los números indican el tiempo de digestión

El vector de clonación utilizado para la obtención de la genoteca de cósmidos, fue el *SuperCos1 Cosmid Vector Kit* de Stratagene (Figura III.5). El vector se cortó con la enzima de restricción *XbaI*, se defosforiló y finalmente se digirió con *BamHI* tal y como se indica en el manual del fabricante. Tras cada reacción enzimática se limpió con fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:2). Por último, se realizó una reacción de ligación que contenía 2,5 µg de DNA genómico y 1 µg de *SuperCos1* (Figura III.6).

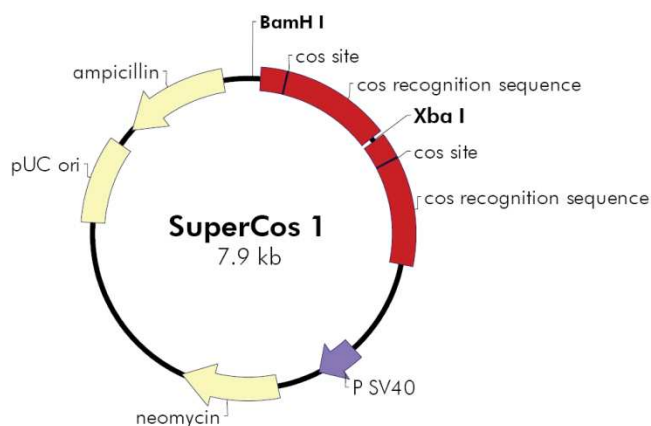


Figura III.5: Esquema del vector utilizado para la construcción de la genoteca de cósmidos de la cepa RV22.

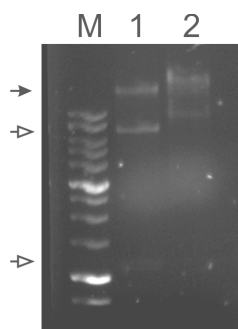


Figura III.6: Control de la reacción de ligación. En el gel se muestra la reacción de ligación antes (1) y después (2) de incubar a 4 °C toda la noche. Se aprecia como tras la reacción de ligación las bandas de 7,5 kb y 1,25 kb que corresponden al vector SuperCos1 desaparecen (flechas blancas). La banda correspondiente al DNA genómico también aumenta de tamaño (flecha negra).

Para el encapsulado de los bacteriófagos e infección se utilizó, según el protocolo, el *kit Gigapack III packaging Extract* (Stratagene) y la cepa de *E. coli* XL1-blue MR (Stratagene). Como resultado final, se obtuvieron 10 placas que contenían 150-200 colonias por placa. Con el objetivo de rastrear la presencia de los genes *vab* se realizaron PCRs a partir de colonias, utilizando parejas de cebadores específicos situados en los extremos 5' y 3' del *cluster* descrito hasta ese momento. Con esta metodología se identificaron los cósmidos MBcos167 y MBcos69 que se utilizaron para ampliar la región secuenciada de 18 kb a las 26 kb finales.

10. Mutagénesis por intercambio alélico

La obtención de mutantes defectivos, para cada uno de los genes estudiados, se realizó por intercambio alélico, intercambiando la copia nativa por una que contenía una delección de la región central del gen. Se amplificaron por PCR los extremos de cada gen, junto con las regiones flanqueantes, utilizando *Expand High Fidelity PCR System* de Roche, con un tamaño de aproximadamente 1 kb, de tal manera que al pegar cada extremo se obtuvo una mutación no polar por delección del gen. Los cebadores utilizados para amplificar los extremos de cada gen junto con las regiones adyacentes se numeraron del 1 al 4 (Tabla III.2). A cada cebador se le añadió a modo de adaptador la secuencia diana de una enzima de restricción que garantizaba la correcta orientación de los fragmentos. Los adaptadores 2 y 3 contenían igual diana de restricción, para asegurar que la construcción se realizaba en la orientación adecuada. Ambos fragmentos (región 3' y 5' de cada gen) se clonaron en el plásmido PWKS30 de modo secuencial utilizando la cepa DH5α. La construcción se liberó del PWKS30 con *NotI* y *Apal* y se ligó al vector suicida pNidKan

linearizado con las mismas enzimas (Mouriño *et al.*, 2004). El pNidKan, como derivado del pCVD442, contiene el origen de replicación R6K que requiere el gen *pir*, por eso se transformó en *E. coli* S17-1- λ *pir*; y el gen *sacB* que confiere sensibilidad a la sacarosa. La construcción se conjugó desde *E. coli* S17-1- λ *pir* a *V. anguillarum*. Tras la conjugación se seleccionaron mediante ampicilina (resistencia natural de RV22) y kanamicina (la confiere el pNidKan) las colonias de *V. anguillarum* en las que la construcción se había integrado en su cromosoma por recombinación homóloga. La característica primordial del plásmido utilizado es su incapacidad de replicarse en *V. anguillarum* al carecer éste del gen λ *pir*, de modo que únicamente se perpetuará cuando se integre en el cromosoma bacteriano por un proceso de recombinación entre secuencias homólogas.

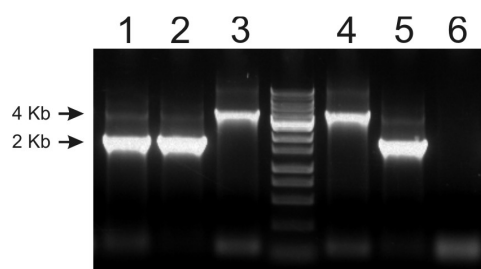


Figura III.7: Rastreo de cepas mutantes tras la 2ª recombinación. 1, 2 indica cepa mutante; 3, cepa revertiente; 4, control positivo con la cepa salvaje; 5, control utilizando la construcción clonada en el plásmido pWKS30 y 6 control negativo.

Se necesita un segundo evento de recombinación para que se libere el plásmido suicida (pNidKan), y con ello arrastre la copia completa. Una vez integrada la construcción en el cromosoma, en el 50% de los casos la segunda recombinación sucederá en la misma región, y en estos casos se libera el pNidKan junto con la copia deleccionada. Pero en el otro 50% de los casos la recombinación se producirá en el otro fragmento, con lo que el plásmido arrastrará la copia intacta del

gen, dejando la copia deleccionada en el cromosoma. Tras realizar unos 5-10 pases en TSC-1, sin presión selectiva para la kanamicina, se plaquearon diluciones en placas de LB suplementado con ampicilina y un 10% sacarosa. Las células capaces de formar colonias son aquellas que han perdido el pNidKan y con ello el *sacB*. Se comprobó por PCR qué colonias eran revertiente y cuales mutantes. Habitualmente se utilizaron los cebadores 1 y 4 (utilizados para realizar la construcción) con lo que los mutantes darán productos de PCR de aproximadamente 2 kb mientras que las revertientes mostrarán tamaños tan grandes como las zonas nativas del gen (Figura III.7). El mecanismo de obtención de mutantes por intercambio alélico se esquematiza en la Figura III.8.

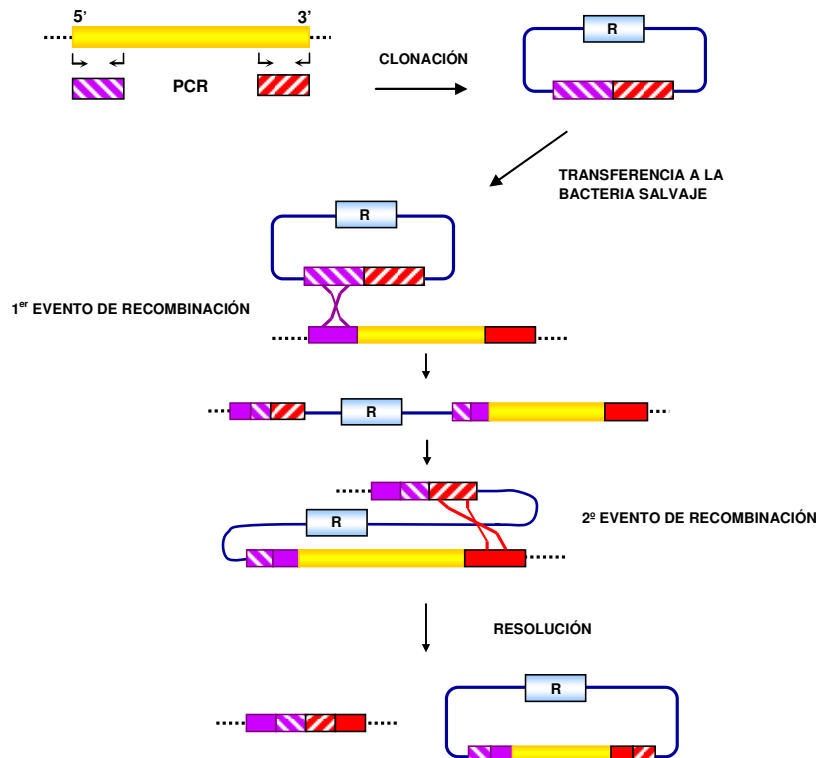


Figura III.8: Esquema del proceso de mutación por intercambio alélico: el alelo mutante se obtiene amplificando las regiones 5' y 3' del gen, y uniendo ambos fragmentos en un mismo plásmido. A través de esta construcción se facilita la transferencia de la copia delecionada a la bacteria. Tras un primer evento de recombinación entre las secuencias homólogas del gen salvaje y la copia mutante, el plásmido se inserta en el cromosoma bacteriano. Las colonias recombinantes son seleccionadas en base al marcador de resistencia a antibiótico del plásmido (R). Tras sucesivos ciclos de multiplicación se selecciona un segundo proceso de recombinación en el que, tras su resolución y en un 50% de los casos, el plásmido se libera del cromosoma y arrastra consigo la copia salvaje del gen. Una vez libre en el citoplasma, el vector se perderá en el momento de la división celular ya que, debido a su origen de replicación R6K, es incapaz de autoreplicarse en la bacteria. El resultado final de todo el proceso es la sustitución cromosómica del gen por su copia delecionada.

Para verificar el correcto intercambio alélico entre el gen salvaje y el gen delecionado, se analizó la pérdida de la región central del gen por *Southern blot* y/o se secuenció. En las hibridaciones destinadas a comprobar la deleción de las regiones intermedias de los genes delecionados se digirieron 5 μ g de DNA genómico, tanto de la cepa

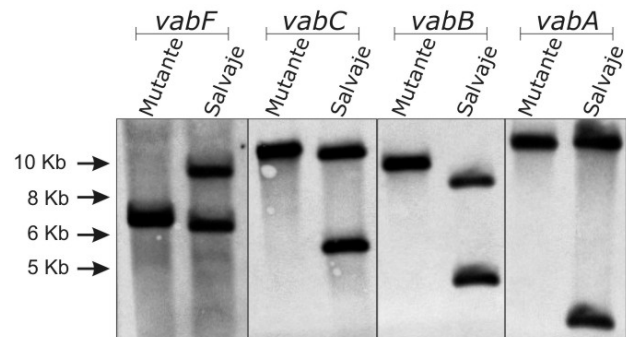


Figura III.9: Comprobación de los mutantes $\Delta vabF$, $\Delta vabC$, $\Delta vabB$ y $\Delta vabA$ mediante *Southern blot*.

salvaje como de la mutante, con una enzima de digestión cuya diana de restricción se encontraba en la región delecionada, de modo que en el salvaje se apreciarán dos bandas mientras que en el mutante sólo se apreciará una, pues esa diana de restricción habrá desaparecido (Figura III.9).

Tabla III.2: Cebadores utilizados en la construcción de mutantes.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3') ^a	aa prot. / aa delec.
Mutante <i>ΔvabE</i>		541/419
ΔVacE 1	gcggatccgtgcaaaaccaacagcgctc	
ΔVacE 2	gcagagatagaattcagcac	
ΔVacE 3	gcgaattccacatccatttcgtcgatga	
ΔVacE 4	gcaagcttcaatatccccgtggtgtaca	
Mutante <i>ΔvabB</i>		286/219
ΔVacB 1	cgggatccggtcttaatctacgcgacgc	
ΔVacB 2	gcgaattcatcgtgaatgagcagtagccg	
ΔVacB 3	gcgaattcgaatcatggcgcaagatggg	
ΔVacB 4	gcaagcttctgttactactcaaggacgtc	
Mutante <i>ΔvabA</i>		258/204
ΔVacA 1	cgtctagatgatccacaacagattacgc	
ΔVacA 2	gcggatccctaccgcataaccaatcccct	
ΔVacA 3	gcggatccgaagacattgctggggtgtg	
ΔVacA 4	gcgaattcaggtgtaccaacagcgactg	
Mutante <i>ΔvabC</i>		393/337
ΔVacC 1	gctctagacaaccccagcaatgtcttcg	
ΔVacC 2	gcggatcccatggtgtgtgaggcgag	
ΔVacC 3	gcggatccacaggggcaaaatgagcac	
ΔVacC 4	gcaagcttctcaattaaacggaaagcgg	
Mutante <i>ΔvabF</i>		2835/2777
ΔVacF 1	cgtctagatggattgatgctcgatggc	
ΔVacF 2	cgggatcccaaaataccttgctgtgtgc	
ΔVacF 3	gcggatcccatgaagatatcttgcccc	
ΔVacF 4	gcgaattctaatgatgagcaaacacc	
Mutante <i>ΔvabS</i>		437/313
ΔExpV 1	gcggatccctttcatccactccaacagc	
ΔExpV 2	gcgaattcctagcaccacagatgctgat	
ΔExpV 3	gcgaattcatccaatgccatgataaggcc	
ΔExpV 4	cgaagcttcaacagcagggt	
Mutante <i>ΔvabH</i>		401/232
ΔFesV 1	gctctagaagaggatgccaatcagtgtg	
ΔFesV 2	gcggatccctgaatcgaaaccgagccact	
ΔFesV 3	gcggatccggtcacgatcgactctgttg	
ΔFesV 4	gcaagcttgactgatggcattcacgctg	
Mutante <i>ΔfvtA</i>		693/615
1_XbaI_FvtA	cgtctagaagtaaaggctcgcatcagcac	
2_BamHI_FvtA	gcggatccgaggatgccaatcagtgtgg	
3_BamHI_FvtA	gcggatccgtgttgaaatctgaatgcagg	
4_EcoRI_FvtA	cggaattctggatcagttctaccacgtg	
Mutante <i>Δorf13</i>		640/500
Del1BamHI_Rec2	gcggatccagtttaacgccgaaagcctcg	
Del2EcoRI_Rec2	gcgaattcggcagattgcataatggcac	
Del3EcoRI_Rec2	cggaaattcggagcggaagtctctatctc	
Del4HindIII_Rec2	cgaagctttccctattagcccagcgaga	
Mutante <i>ΔvabH</i>		403/236
1BanHI_LysR	gcggatcccgatgtgaatcgtttagcgg	
2EcoRI_LysR	gcgaattccacgactgactgacgattgg	
3EcoRI_LysR	gcgaattcatcacaagagaagtcccag	
4HindIII_LysR	cgaagcttagctctttaccaccattggc	
Mutante <i>ΔvabG</i>		352/240
1XbaI_DAHP	gctctagaatgactgagcaagacagg	
2BanHI_DAHP	gcggatccgttagagattgggtaaaggag	
3BanHI_DAHP	gcggatccctctgctacggccaatccat	
4HindIII_DAHP	gcaagcttgattggttatgcggtattgg	
Mutante <i>ΔvabD</i>		236/201
1XbaI_vabD	cgtctagaagagatgaactgaagcgag	
2BamHI_vabD	cgggatcccttcacttcaagctggtggt	
3BamHI_vabD	cgggatccgacagtgagtatgtactgac	
4EcoRI_vabD	gcgaattcatggcttgatgcataaggcgc	

^a La secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador

11. Complementación de los mutantes con el gen salvaje

Para complementar los genes mutados se utilizó el vector pHRP309, utilizado también en las fusiones transcripcionales (Parales & Harwood, 1993). En las complementaciones se amplificaron regiones que incluyen el gen y su promotor completos clonados en dicho vector gracias a la utilización de adaptadores añadidos a la secuencia de los cebadores (Tabla III.3). El pHRP309 no es un vector de expresión, lo que provoca que al clonar un gen en el lugar de clonaje múltiple necesitemos proporcionarle un promotor funcional. De este modo se amplificaron los genes con sus propios promotores para conservar el patrón de expresión natural. Las construcciones se transformaron primero en la cepa de *E. coli* S17-1- λ pir, tras lo cual se introdujeron por conjugación en las cepas de *V. anguillarum* defectivas para el gen determinado, seleccionando la cepa receptora por su resistencia a ampicilina, resistencia natural de *V. anguillarum*, y gentamicina que es la resistencia que confiere el vector. Por último, el plásmido recombinante pHRP309 se aisló de *V. anguillarum* y se digirió con las enzimas incluidas en los adaptadores verificándose de este modo la presencia del inserto. Los datos obtenidos con las cepas complementadas no son comparables cuantitativamente a la cepa salvaje ya que el gen introducido está en un número de copia superior al resto de genes del sistema natural. Los genes complementados y los cebadores utilizados se muestran en la Tabla III.3.

Tabla III.3: Cebadores utilizados en las complementaciones.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3') ^a	Posición ^b
vabA		
proVacA_SmaI	gc <u>cccg</u> gggcacccaatagctgattagcc	6310
VacA-SmaI	gc <u>cccg</u> gggagcagcaatattgtcagccc	5208
vabC		
proVacC_KpnI	gcgg <u>tacc</u> ataccgcataaccaatcccc	6012
VacC_KpnI	gcgg <u>tacc</u> gctgaattgctcaggccaag	7500
vabS		
proFesV_XbaI	gct <u>ctaga</u> atccatgggcttcacacac	22115
FesV_XbaI	cg <u>tctaga</u> caagcatgaatgaacagcgc	20330
vabF		
proFesV_XbaI	gct <u>ctaga</u> atccatgggcttcacacac	22115
VacF_XbaI	gct <u>ctaga</u> gatacgcactggttcg	11758
fvtA		
SaII_FvtA_Comp	cggtcgagcgaataactcctccatcacg	21040
XbaI_FvtA_Comp	gct <u>ctaga</u> agaacactgttcaacccatg	24837

^a La secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador

^b Las posiciones se refieren a la secuencia del *cluster vab* depositada en el EMBL

12. Ensayos de crecimiento en limitación de hierro

Para determinar la capacidad de crecimiento de los mutantes por delección, se realizaron rectas de crecimiento en condiciones restrictivas de hierro. A partir de una colonia, se inocularon 5 ml de LB líquido y se incubó en agitación a 25°C durante 16 h. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica de 0,5 (DO_{600}) y se diluyeron 1:15 en medio mínimo CM9 (Lemos *et al.*, 1988) que contenía ácido etilen-diamino-di-(o-hidroxifenilacético) (EDDA) 5 μ M. Los cultivos se incubaron a 25 °C en agitación (150 rpm) y, una vez transcurridas las primeras 8 h, se monitorizó el crecimiento (DO_{600}) y producción de sideróforo en intervalos de 2 h. Como control positivo se monitorizaron los mismos parámetros sobre cultivos con 10 μ M de $Fe_2(SO_4)_3$ (condiciones de disponibilidad de hierro). Para cuantificar la producción de sideróforos se utilizaron las pruebas del cromo azurol-S (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987) y el ensayo de Arnow (Arnow, 1937) utilizando como control negativo CM9 con la misma concentración de EDDA. Los valores mostrados en todas las gráficas de crecimiento y producción de sideróforo corresponden a los valores medios observados de tres experimentos independientes.

Prueba de cromo azurol-S (CAS). Esta prueba detecta la presencia de sustancias con actividad quelante de hierro utilizando un complejo ferri-cromogénico que cambia de color cuando pierde los iones de hierro. Los sideróforos, que tienen más afinidad por el hierro que el cromógeno, pueden capturar el hierro del complejo ferri-cromógeno, resultando en un cambio del color del colorante de azul a amarillo-anaranjado. Para realizar esta prueba se mezclaron volúmenes iguales de sobrenadante y reactivo de CAS (0,5 ml) (Schwyn & Neilands, 1987). Tras esperar 15 minutos, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm en el espectrofotómetro. Valores de absorbancia más negativos indican mayor concentración de sideróforo en el sobrenadante.

Ensayo de Arnow. Se utiliza específicamente para detectar sideróforos de tipo catecol pues con él se detecta la presencia en el medio de 2,3-DHBA o sustancias que tengan 2,3-DHBA en su estructura. El protocolo seguido fue el siguiente: a 0,5 ml de sobrenadante se añadieron 0,5 ml de HCl 0,5 N. Tras agitar la mezcla, se añadieron 0,5 ml de una disolución compuesta por un 10% de nitrito sódico y un 10% de molibdato sódico en agua. Finalmente

se añadieron 0,5 ml de NaOH 1 N. La aparición de color rojo indica reacción positiva. La reacción se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm.

13. Ensayo de titulación de Fur o FURTA

Para localizar genes regulados por hierro, se puede utilizar un ensayo de titulación de Fur o FURTA (Stojiljkovic *et al.*, 1994), ya que la proteína Fur es el regulador general que reprime la expresión de los genes cuyo promotor contiene “cajas Fur”. Primero, se obtuvo una genoteca de la cepa RV22 con tamaños entre 1 y 3 kb en el plásmido pT7-7. Esta genoteca se electroporó en la cepa indicadora *E. coli* H1717 (Hantke, 1987) y se sembró en placas de MacConkey-lactosa suplementado con 40 μ M de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ siguiendo el procedimiento descrito por Stojiljkovic *et al.* (1994). Las colonias lac⁺ obtenidas se reaislaron en placas del mismo medio. Los fenotipos de las colonias se comprobaron 24 h después de incubarlas a 37 °C. Las colonias lac⁺ son indicativas de que el fragmento clonado contiene regiones que secuestran la proteína Fur de *E. coli* (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Por último se secuenciaron los fragmentos clonados en las colonias FURTA positivas. Para descartar clones que contuviesen insertos repetidos, se aislaron los plásmidos y se sometieron a análisis de perfiles de restricción (RFLPs), de este modo se descartaron aquellos clones que tuviesen el mismo patrón o que su patrón estuviese contenido en otro.

Esta misma metodología se utilizó para comprobar la existencia de “cajas Fur” en las regiones promotoras de los genes *vab*. Con este objetivo se clonaron en el plásmido pT7-7 los fragmentos utilizados en las fusiones transcripcionales, utilizando como control negativo el vector vacío.

14. Extracción de RNA y realización de RT-PCR (*Reverse-Transcriptase PCR*)

La purificación de RNA se realizó a partir de cultivos en fase exponencial ($DO_{600} = 0,4-0,6$) crecidos en 10 ml de medio mínimo CM9. Dependiendo del objetivo del experimento, el CM9 contenía 10 μM de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ o 5 μM de EDDA, condiciones de disponibilidad o restricción de hierro respectivamente. Estos cultivos se inocularon con 200 μL de TSB-1 crecidos durante 12 h. Las extracciones se realizaron con el reactivo RNAwiz (*RNA isolation Reagent RNAwizTM*, Ambion).

Las reacciones de reverso transcripción (RT) se realizaron con la reverso transcriptasa M-MLV (Invitrogen) utilizando como molde 2 μg de RNA tratado previamente con DNasa libre de RNasa RQ1 (Promega). Los cebadores utilizados en las reacciones RT (Tabla III.4 nombrados del RT-0 al RT-6) son homólogos al extremo 3' del gen o grupo de genes cuyo transcrito se quiere detectar. Tras la RT se utilizaron parejas de cebadores para detectar la presencia del cDNA sintetizado por PCR a una temperatura de anillamiento de 55-60 °C según la pareja, 1 U de polimerasa y 1,5 μM de MgCl_2 , y como molde se utilizaron 2 μL de la reacción de retrotranscripción. Como control negativo se emplearon extracciones de RNA (tratado con DNasa) sin reverso transcriptasa, lo que detectaría la presencia de DNA genómico contaminando la muestra. Todos los cebadores utilizados en la RT y posterior PCR se muestran en la Tabla III.4.

Tabla III.4: Cebadores utilizados en los experimentos de RT-PCR y detección de la presencia de los genes *vab* en una colección de cepas *V. anguillarum*.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tamaño amplificado
<i>orf13</i>		
157Rev2 (Cebador RT-0)	tggcgattatccagttgctg	401
pareja157Rev2	tcaggtttgtatcaagagcg	
<i>vabR</i>		
LysR_A (Cebador RT-1)	atcatgaaatcgcttggtgcc	789
LysR_B	gcatgtctcgaatacagcac	
<i>vabG</i>		
DAHP_A	atggattggccgtagcagag	364
DAHP_B (Cebador RT-2)	ccgctaacgattcacatctg	
<i>vabA</i>		
Ip M-angE-5'-7 (Cebador RT-3)	ttcaccatattcgctgttcc	174
M-angE-5'-5	tgatcggctctaattcagcg	
<i>vabC</i>		
RNAvabC	atctgttggtccatcaatcgc	299
M-angE-5'-2	tgacagcatcgtttcggttc	
<i>vabE</i>		
RVangC	cgctatcgtagaacaaggc	310
RVangE-2 (Cebador RT-4)	gcgatagatctcgactcgat	
<i>vabB</i>		
RNAvabB	ttcattggcatgtccaagcc	391
MAngE3'4 (Cebador RT-5)	atatgtgcatagacaccac	
<i>vabS</i>		
ExpMotifA	gataagtagcatcgccgtcg	530
M-angE-3'-8	gagactaaagctaacgcagg	
<i>vabF</i>		
pMB5_R	aatcacgcgcacttcacctg	224
pMB5_-R	tagatggcaacgtgttgac	
<i>vabH</i>		
Del fes1	agaggatgccaatcagtggtg	841
Del fes2	tgaatcgaaaccgagccact	
<i>fvtA</i>		
FvrA3	aaaagtctggagctacgagc	370
FvrA-2	gaaacgtgggttaacacgagc	
<i>vabD</i>		
FvrA4	gtgttgaaatctgaatgcagg	820
VabD-1 (Cebador RT-6)	tggatcagttctaccacgtg	

15. Fusiones transcripcionales y ensayos de actividad β -galactosidasa

El plásmido de bajo número de copia pHRP309 (Parales & Harwood, 1993), específico para la construcción de fusiones transcripcionales, se caracteriza por incluir el gen *lacZ* sin un promotor que regule su expresión (Figura III.10). La clonación de una secuencia con actividad promotora dentro de la región localizada “corriente arriba” de este gen implica que su

transcripción queda bajo el control del inserto clonado. Se amplificaron por PCR, utilizando el kit *Expand High Fidelity PCR System* de Roche, las regiones susceptibles de constituir los promotores de los genes *vabR*, *vabG*, *vabA*, *vabC*, *vabH* y *fvtA*. Los fragmentos amplificados tienen un tamaño que oscila entre 300 y 700 pb e incluyen 50-100 pb aguas abajo del codón de iniciación de la transcripción. Los cebadores utilizados contienen dianas de restricción que actúan a modo de adaptadores, lo que permite clonar los fragmentos en el plásmido pHRP309 en la orientación apropiada (Tabla III.5). Los plásmidos obtenidos constituyen las siguientes fusiones: *vabR::lacZ* (pMB34), *vabG::lacZ* (pMB33), *vabA::lacZ* (pMB19), *vabC::lacZ* (pMB20), *vabH::lacZ* (pMB12) y *fvtA::lacZ* (pMB11), que se movilizaron desde la cepa S17-1- λ pir de *E. coli* a las cepas 775met11 (*fur*⁻) y RV22 de *V. anguillarum*. Los exconjugantes transformados se seleccionaron en base a su resistencia al antibiótico Gm (marcador del pHRP309) y Rif (marcador de resistencia para la cepa 775met11) o Amp (marcador para el resto de cepas de *V. anguillarum*). Como control negativo se utilizaron las mismas cepas de *V. anguillarum* portadoras del vector pHRP309 vacío.

Las cepas de *V. anguillarum* portadoras de las fusiones transcripcionales se crecieron en CM9 en condiciones de disponibilidad (CM9 con 10 μ M de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) y déficit de hierro (CM9 con 5 μ M de EDDA), con o sin vancrobactina sintética. Cuando estos cultivos alcanzaron la densidad óptica deseada, se procedió a medir la actividad β -galactosidasa.

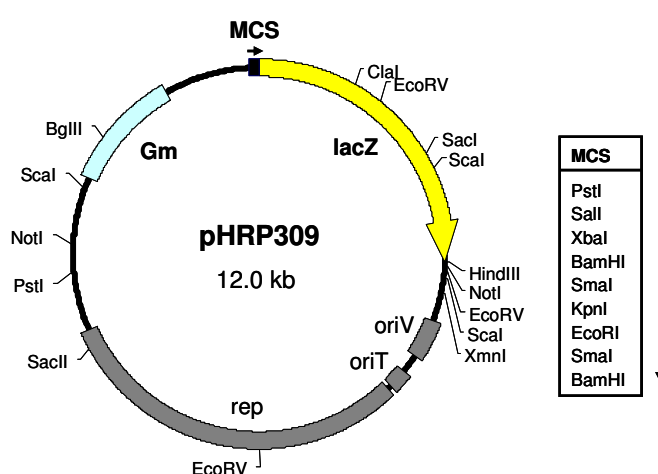


Figura III.10: Mapa del plásmido pHRP309 específico para el ensayo de fusiones transcripcionales. MCS, punto de clonación múltiple.

Para los ensayos de actividad transcripcional los niveles de β -galactosidasa se determinaron siguiendo el método de Miller (1992). Se ensayó cada una de las cepas de *V. anguillarum* portadoras de la fusión correspondiente en medio mínimo CM9, bajo distintas condiciones de disponibilidad y fuentes de hierro.

Las células se incubaron en medio líquido CM9 a 25 °C hasta alcanzar una DO_{600} entre 0,3 y 0,4. De cada cultivo se realizaron dos ensayos con 0,1 y 0,3 ml respectivamente. Ambos se llevaron hasta un volumen final de 1 ml con tampón Z ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 60 mM; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 40 mM; KCl 10 mM; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM; β -mercaptoetanol 50 mM; pH 7,0). Tras añadir 20 μ l de cloroformo y 10 μ l de una disolución de SDS al 0,1%, la mezcla se incubó a 37 °C durante 5 min. La reacción se inició añadiendo 0,2 ml de ONPG (4 mg/ml en tampón Z). Cuando la reacción cambió su color a amarillo, ésta se bloqueó con 0,5 ml de Na_2CO_3 1 M. Finalmente la actividad promotora se cuantificó en Unidades de β -galactosidasa midiendo la absorbancia a 420 nm y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidasa} = DO_{420} \times 1000 / T \times V \times DO_{600}$$

DO_{600} : densidad celular del cultivo justo antes del ensayo (600 nm)

DO_{420} : lectura de la mezcla de reacción a 420 nm

T: tiempo de la reacción (min)

V: volumen del cultivo ensayado (ml)

Los ensayos se repitieron un mínimo de tres veces de manera independiente.

Tabla III.5: Cebadores utilizados en la clonación de las regiones promotoras.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3') ^a	Tamaño amplificado
Promotor <i>vabG</i>		
Sall_DHAP	gcgtcgactcgtacagtacttgctcg	796
BanHI_DHAP	cgggatccgtgcatagtcattgcagcc	
Promotor <i>vabR</i>		
Sall_LysR	cggtcgacgtgcatagtcattgcagcc	796
BanHI_LysR	gcggatccctcgtacagtacttgctcg	
Promotor <i>vabC</i>		
XbaI_1500	cgtctagagtgcattataccagcgcagc	814
BanHI_2200	gcggatccaatggtcgctttgtggctct	
Promotor <i>vabA</i>		
XbaI_2200	gctctagaaatggtcgctttgtggctct	814
BanHI_1500	cgggatccgtgcaatataccagcgcagc	
Promotor <i>vabH</i>		
FesV_XbaI	gctctagaatccatgggcttcatgacct	335
FesV_BanHI	gcggatccagcatgccgaacgattgac	
Promotor <i>fvfA</i>		
FvrA_XbaI	gctctagaaggcatgccgaacgattgac	335
FvrA_BanHI	gcggatcccatccatgggcttcatgacct	

^a La secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador

16. Experimentos de alimentación cruzada y bioensayos

La actividad biológica de los sobrenadantes obtenidos a partir de los diferentes mutantes de *V. anguillarum* se determinó mediante experimentos de alimentación cruzada. Utilizando estos ensayos se pudo comprobar la deficiencia de los mutantes obtenidos, bien en alguna de las etapas de biosíntesis de la vancrobactina o bien en el transporte del sideróforo. Como cepas indicadoras se utilizaron diferentes combinaciones de mutantes, y utilizando siempre la cepa parental RV22 como control. Se utilizaron además como indicadoras dos cepas mutantes (*enb-7* y *enb-1*) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 no productoras de enterobactina (Pollack *et al.*, 1970). Mientras que la cepa *enb-7* puede utilizar DHBA, enterobactina o vancrobactina para crecer en condiciones de limitación de hierro, la cepa *enb-1* sólo puede utilizar enterobactina o vancrobactina (Lemos *et al.*, 1988; Conchas *et al.*, 1991), por lo que se utilizaron como indicadoras de la producción de DHBA (*enb-7*) o vancrobactina (*enb-1*) por parte de los diferentes mutantes de *V. anguillarum* deficientes en la biosíntesis de vancrobactina.

Las cepas indicadoras se cultivaron en TSB-1 durante toda la noche, y a continuación se incluyó 1 ml de este cultivo a una $DO_{600} = 1$ en 20 ml de CM9 con 0,7% de agarosa y una concentración de 2,2'-dipiridil (dipiridil) superior a la CMI de cada una de las cepas indicadoras. En el caso de las cepas de *S. enterica* se utilizó una concentración de 120 μ M de dipiridil.

Las cepas a ensayar se cultivaron en placas de LB con 40 μ M de dipiridil, las células se recogieron con un asa de siembra y se depositaron sobre la superficie del medio conteniendo la cepa indicadora, formando un acúmulo uniforme. Se tomaron como positivos aquellos acúmulos celulares capaces de promover un halo de crecimiento de la cepa indicadora.

También se realizaron bioensayos utilizando el mismo protocolo detallado anteriormente, para determinar la actividad biológica de los extractos obtenidos durante el proceso de aislamiento de vancrobactina y la actividad de sus análogos sintéticos. Las cepas indicadoras se embebieron en CM9 con dipiridil a una concentración de: 120 μ M para las cepas de *V. anguillarum* (RV22 y 775) y *S. enterica* (cepa *enb-1*); y 150 μ M para las cepas de *Erwinia chrysanthemi* (PPV20) y *V. alginolyticus* (TA15). Para la realización de estos bioensayos, cada extracto/compuesto a ensayar (25 μ g) fue embebido en un disco de papel de filtro, que se dejaron secar al aire y se depositaron sobre la superficie de la placa previamente inoculada. Como control positivo se utilizaron 5 μ L de una disolución de $Fe_2(SO_4)_3$ 10 μ M.

17. Hibridación DNA-DNA

Los experimentos de hibridación se realizaron a partir de 5 μ g de DNA cromosómico digerido con una o varias enzimas, en un volumen final de 50 μ L. Una vez incubadas durante 12 h a la temperatura recomendada según la enzima, las reacciones de digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nylon (Boehringer Mannheim) previamente activada con SSC 2X (NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M, pH 7,0). La presencia de los genes *vab* se detectó mediante un *dot blot* realizado a partir de 2 μ g de DNA genómico de cada cepa utilizando un sistema *Minifold*

II (Schleicher & Schuell) (Figura III.11). El DNA transferido se fijó a la membrana con luz UV durante 2 min en un *UV-crosslinker* (Linus). Las sondas utilizadas en la comprobación de los mutantes se obtuvieron en reacciones de PCR utilizando DNA genómico de RV22 y los cebadores 1-4 utilizados en la construcción del mutante. En la determinación de la presencia o ausencia de genes se utilizaron productos de amplificación de cada gen obtenidos con los mismos cebadores empleados en las RT-PCR y utilizando DNA genómico de la cepa RV22 como molde. Todos los productos de PCR usados como sondas se recortaron de un gel de agarosa al 1,5% y se limpiaron con *QIAquick® Gel Extraction Kit*. Los tratamientos a los que se sometió la membrana y el marcaje de la sonda se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del sistema

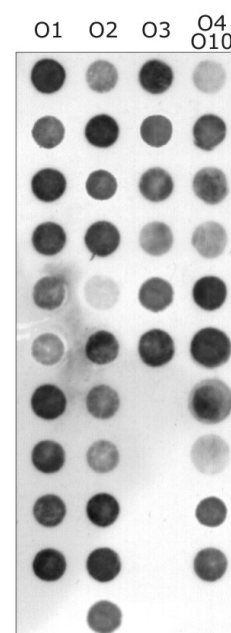


Figura III.11: Dot blot realizado con un fragmento interno de *fvtA* en una colección de cepas de *V. anguillarum* que representan los serotipos O1, O2, O3 y del O4 al O10.

ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Biosciences). Previamente a la incorporación de la sonda, la membrana de nylon se incubó durante 1 h a 42 °C en un horno de hibridación (Hybaid) con el tampón de hibridación *ECL Gold Hybridization Buffer* (Amersham Biosciences) para bloquear posibles uniones inespecíficas de la sonda. Tras la adición de la sonda marcada (10 ng/ml), se continuó la incubación durante 12 h a una temperatura de 42 °C. Para la detección de la señal las membranas se sometieron a diferentes tiempos de exposición empleando el *Hypercassette™* (Amersham Pharmacia-Biotech) y películas de autorradiografía *Hyperfilm™ ECL* (Amersham Biosciences) a temperatura ambiente. En el revelado final se utilizaron reactivos Kodak (*GBX Developer and Replenisher*; *GBX Fixer and Replenisher*).

18. Purificación y análisis de proteínas de membrana externa

Para el análisis de las proteínas de la membrana externa en diferentes cepas de *V. anguillarum* se crecieron las células en CM9 con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 10 μM o EDDA 5 μM (suficiencia o

restricción de hierro respectivamente) a 25 °C y en agitación constante. El procedimiento seguido para la purificación de las proteínas de membrana fue el descrito por Toranzo Toranzo *et al.* (1983c). Las células se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm/15 min (4 °C) y se resuspendieron en 3 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) con NaCl al 0,3%. Las células se rompieron mediante sonicación tratándolas con 3-4 pulsos de 30 s intercalados con periodos de descanso de 30 s en hielo. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación durante 1 min a 13.000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf). El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a 17.000 rpm (centrífuga *AvantiTM J-25* con rotor JA-25.50; Beckman Coulter) durante 60 min a 4 °C. Tras desechar el sobrenadante, el sedimento de membranas totales se resuspendió en 100 µl de agua desionizada y se añadieron 100 µl de lauryl-sarcosinato sódico al 3% en Tris-HCl 20 mM (pH 8,0). Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se centrifugó de nuevo a 17.000 rpm durante 60 min (4 °C). Finalmente se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua destilada.

Las concentraciones de los extractos se determinaron mediante el método Bradford (1976) utilizando como patrón concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina.

Previamente a su análisis electroforético, a cada una de las muestras se le añadió 1 vol de tampón FSB (2X) (Tris-HCl 0,13 M, pH 6,8; SDS 4%; Glicerol 20%; 2-Mercaptoetanol 10%; Azul de Bromofenol 0,002%). Después de calentarlas a 100 °C durante 10 min, las muestras se analizaron por electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida-SDS y con tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 1% p/v). El gel separador estaba compuesto por poliacrilamida al 12,5% (acrilamida/bis-acrilamida 44:0,8) en tampón Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) con SDS al 0,2%. Como catalizadores se utilizaron PSA al 0,02% y TEMED al 0,03%. Por su parte el gel de concentración estaba compuesto por poliacrilamida al 9% (acrilamida/bis-acrilamida 30:0,8) en Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) con SDS al 0,1%, PSA 0,02% y TEMED al 0,4%.

Tras la separación electroforética los geles se tiñeron con Azul de Coomasie (Azul de Coomasie 0,05%; Isopropanol 25%; Ácido acético 10%) durante 2 h y se destiñeron con lavados sucesivos con ácido acético al 5%.

19. Determinación de la estructura química de la vancrobactina

Para aislar y purificar el sideróforo producido por la cepa RV22 se partió de un total de 18 litros de medio CM9 rico en vancrobactina. Para obtenerlos, se cultivó la cepa RV22 en CM9 con 25 μM de dipiridil hasta alcanzar las cotas de crecimiento y producción de sideróforo adecuadas ($\text{DO}_{600} > 1$ y reacción de Arnow $> 0,1$). Una vez alcanzados estos parámetros, se centrifugó el medio a 9.000 rpm en una centrífuga *Avanti™ J-25* con rotor JA-10 (15000 xg) (Beckman Coulter) durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se filtró mediante un sistema de filtración continua (*PREP/SCALE®-TFF CARTRIDGE*, Millipore). Partiendo de estos 18 litros de sobrenadante, en colaboración con el Dr. Carlos Jiménez del Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña, se probaron diferentes estrategias de fraccionamiento y extracción, con el objetivo de obtener una fracción de vancrobactina pura. En nuestro laboratorio se analizó la actividad biológica de cada una de las fracciones obtenidas a lo largo del proceso. Mediante bioensayos (ver apartado 16 de esta sección) se evaluó la capacidad de las diferentes fracciones para promover el crecimiento de la cepa RV22. Esta cepa se cultivó en TSB-1 durante toda la noche y 1 ml del cultivo obtenido se embebió en CM9 con 0,7% de agarosa y una concentración de dipiridil de 100 μM (concentración suficiente para inhibir su crecimiento). Las diferentes fracciones y extractos obtenidos se disolvieron en los disolventes adecuados a cada caso y se colocaron en discos de papel que se dispusieron sobre la superficie de la placa previamente inoculada. Los extractos y fracciones capaces de inducir el crecimiento de la cepa RV22 en estas condiciones eran candidatos a contener vancrobactina activa. El diámetro del halo de crecimiento obtenido alrededor de cada disco se utilizó también como indicador cuantitativo de la actividad biológica de cada fracción.

El sobrenadante obtenido (18 l) se sometió en primer lugar a una cromatografía de intercambio iónico utilizando la resina XAD-7. Tras un lavado con agua destilada se eluyó la columna con metanol/agua (1:1) y se realizó a continuación una segunda elución con metanol. Las fracciones activas se disolvieron en agua y se sometieron a un proceso de extracción líquido-líquido con CH_2Cl_2 o *n*-Butanol. Las fracciones acuosas activas se sometieron a separación mediante cromatografía en una columna de Sephadex LH-20. La

columna fue también eluida con metanol/H₂O. Finalmente, cada fracción activa se sometió a purificación mediante HPLC en fase reversa con una columna Atlantis C18 (100 X 4,6 mm, 5 µm) y un gradiente de acetonitrilo (0% - 50%, 10 min) en 0,05% de ácido trifluoroacético. Finalmente se obtuvieron un total de 0,8 mg de vancrobactina pura.

El compuesto puro obtenido se sometió a análisis estructural mediante diferentes técnicas espectroscópicas, espectrometría de masas y RMN para determinar su masa molecular y estructura química. Todos estos ensayos fueron realizados en el Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña.

IV. Resultados y Discusión

1. Identificación de la región cromosómica que codifica el sistema de la vancrobactina

Los resultados aportados por estudios previos han permitido elaborar una serie de premisas que sirven de punto de partida para este trabajo: (1) la proteína Fur reprime los genes regulados por la concentración intracelular de hierro en *V. anguillarum* (Tolmasky *et al.*, 1994), (2) la vancrobactina es un sideróforo de tipo catecol codificado por genes cromosómicos (Lemos *et al.*, 1988; Conchas *et al.*, 1991), y (3) probablemente alguna de las secuencias homólogas a genes de síntesis de DHBA, descritas en el cromosoma de cepas del serotipo O1, intervienen en la síntesis de vancrobactina, pues en la conversión de corismato a DHBA participan homólogos de los genes de *E. coli* *entCBAE*. Estos genes están conservados en todos los sistemas de catecoles y suelen agruparse en una misma región (Fischbach *et al.*, 2008). El plásmido pJM1 no codifica determinadas funciones necesarias para la síntesis de DHBA. Así, contiene un pseudogen ψ *angE*, homólogo a *vibE* y *entE* de *V. cholerae* y *E. coli* respectivamente (Welch *et al.*, 2000), que codifican enzimas indispensables en la producción de sideróforos de tipo catecol. Este hecho implica por tanto la necesaria existencia de un homólogo funcional de *angE* en el cromosoma de *V. anguillarum*.

En un estudio de expresión génica con la cepa 90-11-287 del serotipo O1 de *V. anguillarum*, Holmstrom *et. al* (2003) secuenciaron un clon que contenía parte de un homólogo cromosómico de *angE* y cuya secuencia no presentaba la mutación que impide que el gen *angE* plasmídico sea funcional. Este gen por lo tanto era un firme candidato a participar en la síntesis de DHBA. Por tratarse pues de un gen cromosómico y no plasmídico, esta copia de *angE* podría estar también presente en el cromosoma de las cepas productoras de vancrobactina.

Basándonos en estas premisas, nos planteamos clonar el gen *angE* y sus regiones cromosómicas adyacentes (mediante PCR inversa) tomando como punto de partida la secuencia de *angE* publicada por Holmstrom *et. al* (2003), a la vez que realizamos un ensayo de titulación de Fur (FURTA) a partir de una genoteca de la cepa RV22. Con estas dos

aproximaciones, conjuntamente, se localizaron los genes cromosómicos responsables de la producción y utilización de la vanrobactina en *V. anguillarum*.

Previamente a la realización de la PCR inversa, se comprobó la presencia del homólogo cromosómico de *angE* en la cepa RV22. Posteriormente y utilizando el producto de amplificación obtenido previamente, se realizó un Southern blot sobre digestiones de DNA genómico de RV22, lo que sirvió para localizar dicho homólogo en un fragmento *HindIII*-*HindIII* de unas 8 kb (Figura IV.1). A la fracción con tamaños comprendidos entre 7-9 kb de una digestión de DNA genómico de la cepa RV22 con *HindIII*, se le añadió ligasa para recircularizar los fragmentos lineales, que finalmente se utilizaron como molde para la realización de PCR inversa, obteniéndose un producto de amplificación de 7 kb. Este fragmento se secuenció completamente, y se evidenció que contenía 5 ORFs que codificaban proteínas con funciones relacionadas con la síntesis de DHBA, grupo funcional de los sideróforos de tipo catecol.

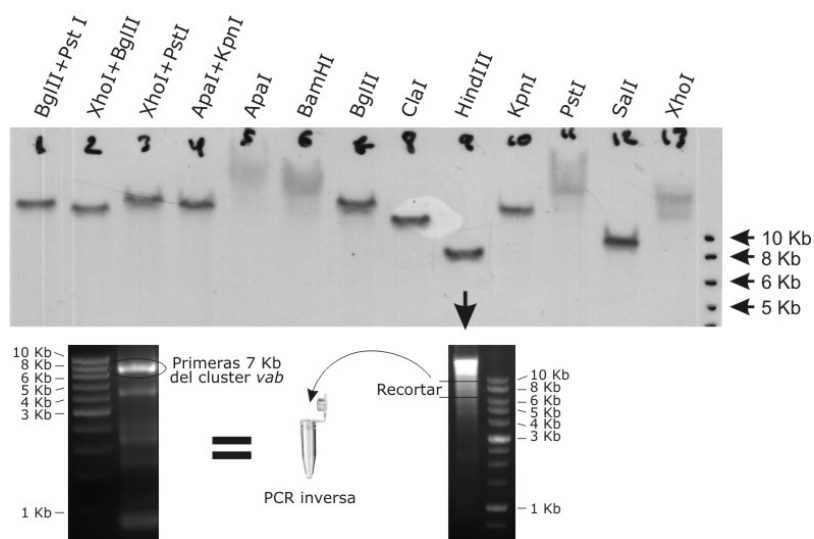


Figura IV.1: Esquema metodológico del experimento de PCR inversa a partir de la secuencia conocida del homólogo cromosómico de *angE*.

En paralelo a la PCR inversa, también se realizó un ensayo de titulación de la proteína represora Fur (ensayo FURTA) con el fin de identificar genes involucrados en la síntesis de vanrobactina. Con esta técnica se aislaron aproximadamente 200 clones con fenotipo FURTA (+). Mediante PCR, detectamos 24 clones que contenían genes de los sistemas de captación de grupo hemo (genes *huv*), sistema *tonB1* y sistema *tonB2* caracterizados previamente en esta especie por nuestro grupo (Mouriño *et al.*, 2004; Stork *et al.*, 2004).

Tras descartar clones que contenían insertos ya repetidos, se seleccionaron finalmente 25 clones para su secuenciación. Así, mediante esta técnica, se identificaron una serie de genes regulados por la proteína Fur. Las proteínas codificadas por estos genes, así como los porcentajes de identidad y de similitud con proteínas homólogas descritas en otras especies bacterianas se describen en la Tabla IV.1. Entre estas proteínas identificadas se incluyen proteínas de sistemas de captación de hierro, así como proteínas relacionadas con diversas funciones celulares: (i) respuesta a estrés, (ii) transporte de sustancias, y (iii) una gran variedad de reguladores.

De todos los genes identificados mediante el ensayo FURTA se seleccionaron dos grupos de genes que, por su similitud con genes biosintéticos de sistemas de sideróforos en otras especies, constituían claros candidatos a estar involucrados en la síntesis de la vancrobactina. Estas dos regiones se muestran en la Figura IV.2 como regiones Furta-1 y Furta-2 respectivamente. Además, la región Furta-1 solapa parcialmente con la región identificada mediante PCR inversa a partir del gen homólogo a *angE* (Fig. IV.2). De este modo, partiendo de las regiones FURTA positivas y de la secuencia parcial del *angE* cromosómico de Holmstrom *et. al* (2003) conseguimos secuenciar una región de ca. 18 kb que contiene genes con gran similitud a otros sistemas de síntesis de sideróforos y que hemos denominado genes *vab*. Finalmente, para ampliar la región secuenciada, se construyó una genoteca de cósmidos y se localizaron, mediante PCR, varios clones que contenían total o parcialmente el sistema de genes *vab*. Gracias a estos clones se extendió la secuencia en ambos extremos hasta secuenciar el *cluster* entero con un tamaño de 26 kb (Figura IV.2). Se consideró que la secuenciación del *cluster* de genes *vab* se había completado cuando, al estudiar las homologías de los genes que lo flanquean (lipasa y NADH-quinona reductasa) se observó que no guardaban relación alguna con sistemas de captación de hierro.

Tabla IV.1: Relación de clones FURTA (+) y homología de los ORFs que contienen.

Clon FURTA (+) de <i>V. anguillarum</i>	nº acceso	Identidad (%)	Similitud (%)
12, 110, 166, 188			
<i>ABC transporter related (Rhizobium leguminosarum)</i>	ZP_02291988.1	55	68
<i>Putative solute-binding component of cationic transporter (R. leguminosarum)</i>	Yp:767621.1	48	64
<i>Methyl-accepting chemotaxis protein (Vibrio parahaemolyticus)</i>	YP_002668312.1	99	100
105, 127, 147, 157, 182, 189 (Furta-1)			
ORF13*	-	-	-
VabR *	-	-	-
VabA*	-	-	-
111			
<i>Transposase (Shewanella halifaxensis)</i>	Yp_001674741.1	58	75
<i>Hypothetical protein (Vibrio fischeri)</i>	Yp_002158404.1	55	70
<i>Two component sensor histidine kinase (Vibrio cholerae)</i>	Zp_01978095.1	61	76
131			
<i>Universal stress protein UspB (Vibrio vulnificus)</i>	AAO09593.1	83	90
<i>Signal transduction protein (V. vulnificus)</i>	AA010733.1	75	93
145			
<i>Universal stress protein UspA (V. vulnificus)</i>	NP_932867.1	73	84
<i>Ferritin-like protein 2 (V. cholerae)</i>	EEO19556.1	94	97
154			
<i>Putative acetate efflux pump, MadN (Vibrio splendidus)</i>	YP_002415776.1	48	58
<i>NAD(FAD)-utilizing dehydrogenase (V. cholerae)</i>	EEO12103.1	73	80
119, 156, 165, 174, 176, 177, 178, 183 (Furta-2)			
VabF*	-	-	-
VabH*	-	-	-
FvtA*	-	-	-
168			
<i>Undecaprenol kinase, putative (V. cholerae)</i>	ZP_01678013.1	83	89
175			
<i>Transposase (Vibrio sp.)</i>	ZP_01813767.1	48	54
<i>Putative manganese-dependent inorganic pyrophosphatase (V. vulnificus)</i>	NP_934174.1	68	78
184			
<i>Oxidoreductase (Vibrio harveyi)</i>	YP_001443766	84	93

* Proteína con función relacionada con sistemas de sideróforos. Homología detallada en Tabla IV.2 y IV.3

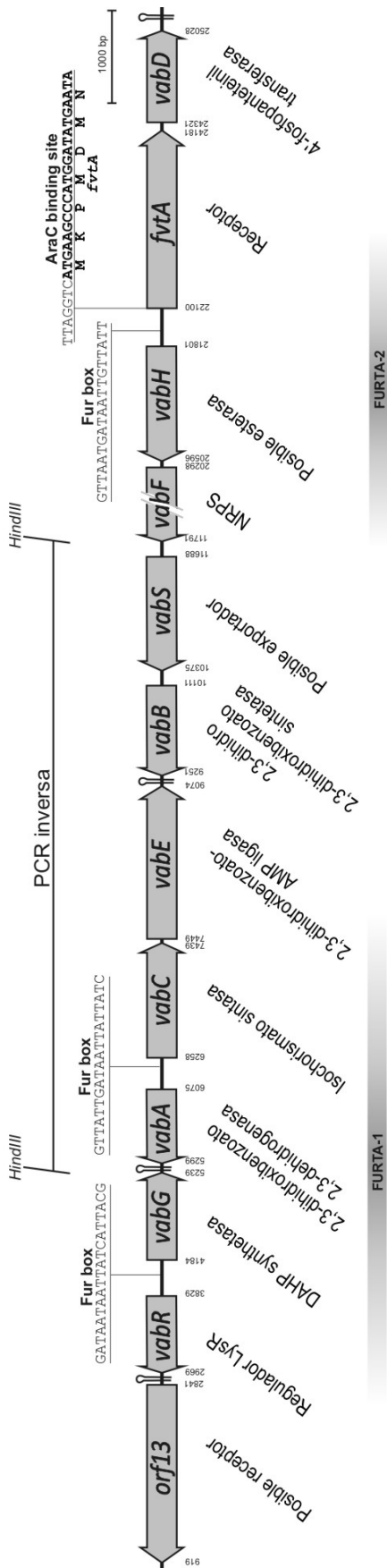


Figura IV.2: Mapa del sistema de genes de la vancrobactina del cromosoma de la cepa RV22 de *V. anguillarum*. Los *orfs* se representan por flechas. Se marcan con números la posición de inicio y fin de cada gen. Como Furta-1 y Furta-2 se marcan las zonas descritas mediante el ensayo de titulación de Fur. Se muestra también el fragmento *HindIII-HindIII* caracterizado a partir de la PCR inversa.

1.1 Predicción de *orfs* y estudio de homologías

A medida que avanzaba la secuenciación se realizó la predicción de los posibles *orfs* presentes en esta región y con las secuencias de aminoácidos obtenidas se procedió al análisis de homologías. De esta forma se reveló la presencia de 13 posibles genes que codifican proteínas con funciones homólogas a enzimas de biosíntesis de sideróforos (*vabABCDEF* y *mbtH*); de secreción (*vabS*); dos posibles receptores dependientes de TonB (*fvtA* y *orf13*); una esterasa de hierro-sideróforo (*vabH*); un regulador transcripcional (*vabR*) y un gen que intervendría en la ruta de síntesis del corismato (*vabG*) (Figura IV.2).

Las proteínas codificadas por *vabA*, *vabB* y *vabC* son homólogas a diversas 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato dehidrogenasas, isocorismatasas y corismato sintasas necesarias para la síntesis de DHBA; sus homólogos más estudiados son EntA, EntB y EntC de *E. coli* (Walsh *et al.*, 1990; Earhart, 1996) (Tabla IV.2). Una vez sintetizado el DHBA se inicia el proceso de ensamblaje con la activación por adenilación mediante una 2,3-dihidroxibenzoato-AMP ligasa, función asignada a VabE según sus homólogos. Posteriormente las NRPS añadirán a la estructura del sideróforo en formación el resto de sus constituyentes. En *E. coli* EntE y EntF son la 2,3-dihidroxibenzoato-AMP ligasa y la NRPS que intervienen en estos procesos (Ehmann *et al.*, 2000). VabF es homóloga a miembros bien caracterizados de la familia de las NRPS, como EntF de *E. coli* (Rusnak *et al.*, 1991), CbsF de *Chromobacterium violaceum* y DhbF de *Acinetobacter baumannii* (Dorsey *et al.*, 2003) (Tabla IV.2). Por último, los dominios transportadores (ArCP y PCP) deben ser activados por una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) para así disponer de un sistema de NRPS funcional. Esta es la función descrita de los homólogos de VabD (Tabla IV.2). Por tanto, los productos proteicos de *vabA*, *B*, *C*, *E*, *F* y *vabD* incluyen los componentes básicos necesarios para la síntesis de un sideróforo de tipo catecol y por tanto podríamos estar ante el sistema de síntesis de vancrobactina.

El *cluster* de genes *vab* también contiene un *orf* (*vabG*) que codificaría una DAHP sintasa. Las DAHP sintasas intervienen en la ruta del siquimato (síntesis de aminoácidos aromáticos) en la que se produce el corismato necesario para la síntesis de DHBA.

Además de genes relacionados con la biosíntesis, el *cluster* de genes *vab* codificaría proteínas con otro tipo de funciones relacionadas con el transporte, regulación y utilización del sideróforo. Las proteínas identificadas incluyen: VabR, un posible regulador

transcripcional de la familia LysR; VabS, un homólogo de EntS, el exportador de la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) que interviene en el proceso de secreción de enterobactina (Furrer *et al.*, 2002); FvtA y ORF13, dos posibles receptores de membrana externa y VabH, una proteína homóloga a numerosas hierro-sideróforo esterasas (Tabla IV.3).

Una vez realizado el análisis preliminar de la función de los genes de síntesis, analizamos las secuencias que podrían codificar posibles receptores de sideróforos. FvtA y ORF13 son homólogos de numerosos receptores de sideróforos de tipo catecol bien caracterizados. Los homólogos de FvtA son receptores como el de la enterobactina de *Chromobacterium violaceum* (CirA), vibriobactina de *Shewanella* o *Vibrio cholerae* (ViuA) (Butterton *et al.*, 1992) y VuuA, el receptor de vulnibactina caracterizado en *V. vulnificus* (Webster & Litwin, 2000). El producto proteico codificado por *orf13* es homólogo, entre otros, a FepA, el receptor de enterochelina y colicinas de *V. alginolyticus* y a IrgA, el receptor de enterobactina en *V. cholerae* (Goldberg *et al.*, 1992).

Alice *et al.* (2005) utilizando la cepa 775 de *V. anguillarum* que produce anguibactina pero no vancrobactina, identificaron una región cromosómica con tres genes completos, que denominaron copia cromosómica de *angACE* (*angACE_{ch}*). Sus resultados indican que *angA_{ch}* es esencial para la síntesis de anguibactina, pues su homólogo plasmídico (en pJM1) es un pseudogen. Sin embargo, los genes *angB_{ch}* y *angE_{ch}* no son esenciales para su síntesis, pues codifican funciones redundantes con los genes plasmídicos *angE* y *angC*. Como veremos en los siguientes apartados, estos tres genes son piezas del sistema de la vancrobactina (genes *vabACE*) y no se consideran una copia cromosómica de los genes plasmídicos. Este hallazgo, junto con numerosos resultados que veremos a lo largo de este trabajo, abre grandes interrogantes acerca de las relaciones evolutivas existentes entre los sistemas de la anguibactina y la vancrobactina.

Tabla IV.2: Relación de proteínas homólogas a los productos de los genes de biosíntesis de vancrobactina caracterizados en este trabajo en la cepa RV22 de *V. anguillarum*.

Proteína de <i>V. anguillarum</i> (aa/MDal)	nº acceso	Identidad (%)	Similitud (%)
VabG (305/33,07)			
DAHPSintetasa (<i>V. anguillarum</i>)	AAO92362	69	84
DAHPSintetasa (<i>V. vulnificus</i>)	AAO07756	58	72
DAHPSintetasa (<i>E. coli</i>)	AAN79680	55	70
DAHPSintetasa (<i>Shigella boydii</i>)	ZP_00697486	57	69
VabC (397/43,39)			
AngCch (<i>V. anguillarum</i>)	AAW66008	98	99
AngC (<i>V. anguillarum</i>)	AAO92360	70	84
ViuC (<i>V. vulnificus</i>)	AAO07758	66	79
VibC (<i>V. cholerae</i>)	AAC45925	62	80
VabB (286/32,73)			
AngBch (<i>V. anguillarum</i>)	AAW66010	97	98
AngB (<i>V. anguillarum</i>)	AAO92358	64	78
VibB (<i>V. cholerae</i>)	AAG00563	59	76
ViuB (<i>V. vulnificus</i>)	NP_937360	53	71
DhbB (<i>Acinetobacter baumannii</i>)	AAN28931	50	67
VabA (258/28,32)			
AngAch (<i>V. anguillarum</i>)	AAW66007	98	98
ViuA (<i>V. vulnificus</i>)	AAO07757	60	77
VibA (<i>V. cholerae</i>)	AAF93939	54	72
EntA (<i>Bacillus cereus</i>)	AAP09266	45	61
VabE (541/60,31)			
AngEch (<i>V. anguillarum</i>)	AAW66009	97	98
AngE (<i>V. anguillarum</i>)	AAO92359	62	76
VibE (<i>V. cholerae</i>)	ZP_00750963	62	77
ViuE (<i>V. vulnificus</i>)	NP_937357	60	72
VabF (2835/316,52)			
CbsF (<i>Chromobacterium violaceum</i>)	AAQ59905	44	60
NRPS (<i>Yersinia frederiksenii</i>)	ZP_00829712	51*	68*
Peptide synthetase (<i>Bacillus cereus</i>)	AAP09419	27	47
EntF (<i>E. coli</i>)	AAN79148	40*	55*
NRPS (<i>Thermobifida fusca</i>)	AAZ55900	32	48
DhbF-like (<i>A. baumannii</i>)	AAN28936	42*	60*
VabD (235/26,96)			
EntD (<i>Marinomonas sp.</i>)	ZP_01076777	34	61
EntD (<i>Photobacterium profundum</i>)	YP_133485	34	55
VibD (<i>V. cholerae</i>)	EDN13617	34	55
EntD (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	YP_349971	35	55

* Homología restringida a uno de sus dominios.

Tabla IV.3: Relación de proteínas homólogas a los productos de los genes de transporte o utilización de vancrobactina caracterizados en este trabajo en la cepa RV22 de *V. anguillarum*.

Proteína de <i>V. anguillarum</i> (aa, MDal)	nº acceso	Identidad (%)	Similitud (%)
VabS (437/46,27)			
Probable proteína MFS (<i>C. violaceum</i>)	AAQ59909	59	74
P45 (<i>A. baumannii</i>)	AAN28937	48	69
p43 (<i>E. coli</i>)	CAA40706	48	70
Proteína MFS (<i>Shigella. boydii</i>)	ZP_00697587	48	70
FvtA (693/77,21)			
CirA, Receptor de enterobactin (<i>C. violaceum</i>)	NP_901900	39	57
ViuA, Receptor de vibriobactina (<i>V. cholerae</i>)	NC_002505.1	31	50
CirA, Receptor de vulnibactina (<i>V. vulnificus</i>)	NP_937365	31	47
VabH (429/45,55)			
Esterasa de enterochelina (<i>Yersinia frederiksenii</i>)	ZP_00829710	38	54
Esterasa de enterochelina (<i>Yersinia bercovieri</i>)	ZP_00823579	38	53
Esterasa de enterochelina (<i>C. violaceum</i>)	NP_901901	35	54
Esterasa de enterochelina (<i>Yersinia intermedia</i>)	ZP_00833719	39	53
Fes (<i>E. coli</i>)	AAN79146	37	53
Esterasa de enterochelina (<i>Salmonella enterica</i>)	NP_806023	35	52
VabR (286/32,85)			
LysR (<i>V. alginolyticus</i>)	ZP_01260503	63	79
LysR (<i>V. harveyi</i>)	EDL67341	55	74
LysR (<i>V. splendidus</i>)	ZP_00988694	55	74
LysR (<i>Vibrio shilonii</i>)	ZP_01865776	48	69
ORF13 (640/71,55)			
FepA, receptor de enterochelina (<i>V. alginolyticus</i>)	ZP_01260504	59	77
IrgA, receptor de enterobactina (<i>V. cholerae</i>)	ZP_01950374.1	44	61

2. Genes de síntesis de vancrobactina

Con el objetivo de caracterizar la función de cada uno de los genes identificados, se construyeron mutantes por intercambio alélico de todos aquellos genes que, según el estudio de homologías y datos bibliográficos, podrían estar relacionados con la síntesis, transporte o utilización de sideróforos. A la hora de determinar la función real de cada uno de los genes es indispensable disponer de cepas defectivas y de la metodología adecuada para estudiar sus fenotipos. Así, dependiendo de la función esperada de cada gen, se diseñaron experimentos específicos. Con cada cepa mutante se obtuvieron curvas de crecimiento en condiciones de disponibilidad y déficit de hierro, se realizaron pruebas para la determinación de la presencia de compuestos quelantes de hierro (CAS) y de catecoles (Test de Arnow) en los sobrenadantes de los cultivos, y se diseñaron bioensayos utilizando diferentes cepas indicadoras. Todo ello proporcionó una valiosa información relacionada con las funciones de cada gen. Esta información, sumada a los datos obtenidos a partir de los análisis *in silico* de las secuencias de las proteínas, nos permitirá proponer un esquema de síntesis y utilización de la vancrobactina.

2.1 Síntesis de DHBA: *vabA*, *vabB* y *vabC*

Como hemos visto, basándonos en sus homologías, los genes *vabA*, *vabB* y *vabC* codificarían las funciones necesarias para la síntesis de DHBA. Según esto, los mutantes que tengan anulados estos genes, deberían ser deficitarios en la producción de vancrobactina al no poder sintetizar el DHBA.

En la Figura IV.3 se muestran las curvas de crecimiento obtenidas al registrar las primeras 24 h de crecimiento de la cepa parental RV22 y cepas mutantes, monitorizándose así la totalidad de la fase exponencial. Cuando se cultivaron las cepas mutantes MB12 ($\Delta vabA$), MB11 ($\Delta vabB$) y MB10 ($\Delta vabC$) en medio mínimo con hierro (CM9 con 10 μM de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) ninguna cepa evidenció limitación alguna en su tasa de crecimiento (Figura IV.3a). Mientras la cepa salvaje RV22 soporta concentraciones de EDDA superiores a 30 μM , las cepas mutantes mostraron una CMI de EDDA de 5 μM . La capacidad de crecer en estas

condiciones (CM9 con 5 μ M de EDDA) se tomará como referencia en el análisis del resto de mutantes.

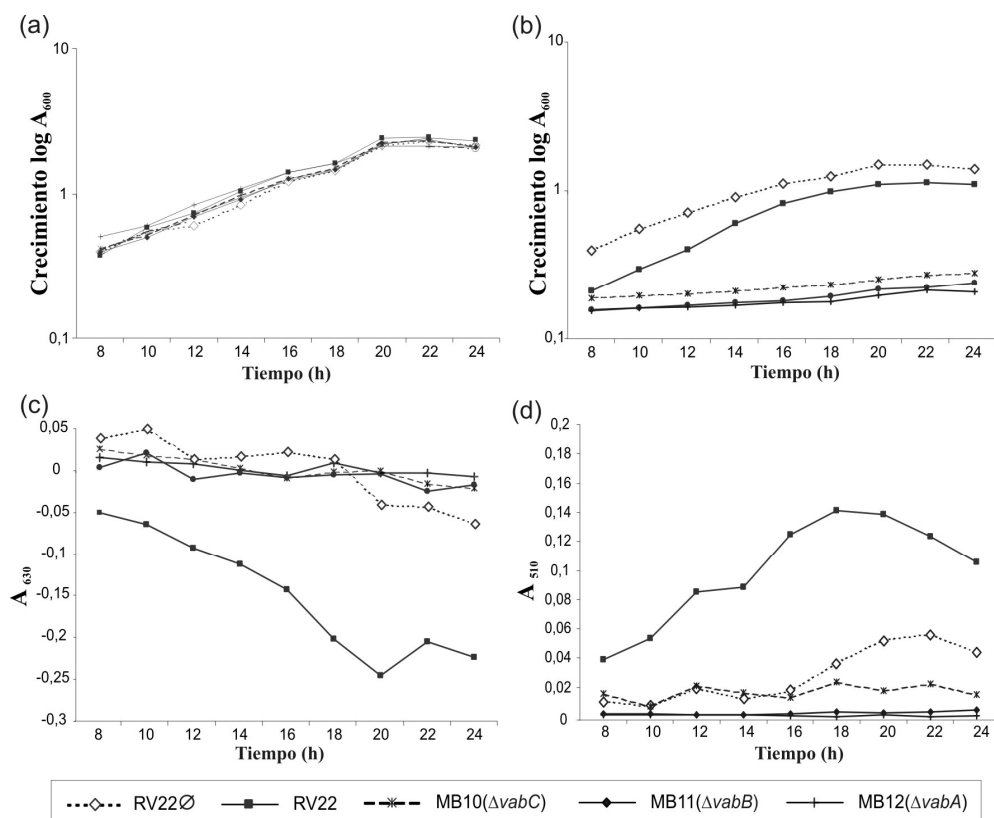


Figura IV.3: Crecimiento en condiciones de (a) disponibilidad y (b) restricción de hierro, (c) producción de sideróforo (CAS) y (d) producción de DHBA (Arnow) de las cepas mutantes MB10, MB11 y MB12 y de la cepa RV22 de *V. anguillarum*. Ø indica el crecimiento de RV22 sin añadir quelante o fuente de hierro alguna.

Como vemos en la Figura IV.3b los mutantes no son capaces de crecer en déficit de hierro. Para determinar si este fenotipo estaba relacionado con la pérdida de la capacidad de sintetizar sideróforo, se realizaron pruebas de CAS y Arnow con los sobrenadantes obtenidos a lo largo de la curva de crecimiento. Los valores de CAS obtenidos con las cepas mutantes fueron entre cinco y diez veces menores a los alcanzados por la cepa parental (RV22). Estos resultados manifiestan la pérdida de la capacidad de producir sideróforo. Cuando realizamos el test de Arnow (Figura IV.3d) vemos cómo la producción de DHBA en los mutantes MB12 ($\Delta vabA$) y MB11 ($\Delta vabB$) está completamente suprimida mientras que en la cepa MB10 ($\Delta vabC$) se detecta una producción residual de este compuesto.

A modo de control se monitorizaron crecimiento y producción de sideróforo en la cepa RV22 crecida en CM9 (sin añadir EDDA ni $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). En estas condiciones no se detecta

producción de sideróforo durante las primeras 18 horas de crecimiento, sólo se activa su síntesis cuando nos acercamos al final de la fase exponencial (RV22 \emptyset en la Figura IV.3c y IV.3d).

Los resultados obtenidos con el mutante MB10 ($\Delta vabC$) sugieren que en esta cepa se mantiene una producción residual de DHBA, lo que indica que otra proteína está complementando esta función. En *E. coli* se ha descrito que MenF, enzima relacionada con la síntesis de megaquinonas, es capaz de mantener en una cepa *entC*⁻ cierta producción de isocorismato, lo que sustenta una pequeña producción de enterobactina (Buss *et al.*, 2001). Se ha descrito con anterioridad una situación análoga en la cepa 775 de *V. anguillarum*, donde para suprimir totalmente la producción de DHBA es necesario obtener un triple mutante $\Delta angC$ - $\Delta angC_{ch}$ - $\Delta menF$ (Alice *et al.*, 2005).

El modo más eficaz para detectar la producción de DHBA o vancrobactina es la realización de ensayos de alimentación cruzada (bioensayos). Como se explica en materiales y métodos, las cepas de *S. enterica enb-1* y *enb-7* son deficientes en la producción de enterobactina, aunque pueden utilizar vancrobactina como fuente de hierro. *enb-1* produce DHBA pero no enterobactina, a diferencia de *enb-7* que no produce DHBA pero puede utilizar DHBA exógeno para producir enterobactina. Los bioensayos muestran cómo la cepa salvaje *V. anguillarum* RV22 y *S. enterica enb-1*, pero no *enb-7*, promueven el crecimiento de MB10 ($\Delta vabC$), al aportar respectivamente vancrobactina y DHBA (Tabla IV.4). Al contrario, el sobrenadante del mutante *vabC* (MB10) no sustenta el crecimiento de *enb-7*. Esta cepa produce cantidades residuales de DHBA-vancrobactina pero no en cantidad suficiente como para alimentar a *enb-7*, al menos en las condiciones ensayadas (Tabla IV.4).

Tabla IV.4: Resultados de los experimentos de alimentación cruzada utilizando *enb-1* y *enb-7* de *S. enterica* y el mutante MB10 ($\Delta vabC$) de *V. anguillarum* como cepas indicadoras.

Cepa ensayada	Capacidad para promover el crecimiento de:		
	<i>enb-1</i>	<i>enb-7</i>	MB10 ($\Delta vabC$)
RV22	+	+	+
<i>enb-1</i>	NA	+	+
<i>enb-7</i>	-	NA	-
MB10 ($\Delta vabC$)	-	-	NA
MB3 ($\Delta vabE$)	-	+	+
MB14 ($\Delta vabF$)	-	+	+

NA. No aplicable

Para poder asegurar que los fenotipos observados se deben exclusivamente a la delección del gen estudiado y no a efectos polares u otras causas, se procedió a complementar las cepas mutantes con sus respectivos alelos salvajes. Se amplificaron por PCR los genes y se clonaron en el vector pHRP309 (Parales & Harwood, 1993) (ver materiales y métodos). Este plásmido no es un vector de expresión, por lo que al clonar un gen en el lugar de clonaje múltiple es necesario proporcionar un promotor funcional. Por este motivo se decidió utilizar el promotor propio del gen, lo que permite conservar el patrón de expresión natural. Por la metodología elegida, sólo se complementaron los genes situados junto a sus promotores, en este caso *vabC* y *vabA* (Figura IV.2). Al complementar las cepas MB10 (*vabC*) con pMB13 (plásmido que contiene el gen *vabC* y su promotor) y MB12 (*vabA*) con el plásmido pMB14 (contiene *vabA* y su promotor) se restauraron los parámetros de crecimiento y producción de DHBA/sideróforo (Figura IV.4).

Todos los resultados obtenidos indican claramente que *vabA*, *vabB* y *vabC* están relacionados con la síntesis de DHBA, grupo funcional que define a los sideróforos de tipo catecol, y que estos genes son esenciales para sustentar la producción de vancrobactina y el crecimiento de *V. anguillarum* RV22 en condiciones de déficit de hierro.

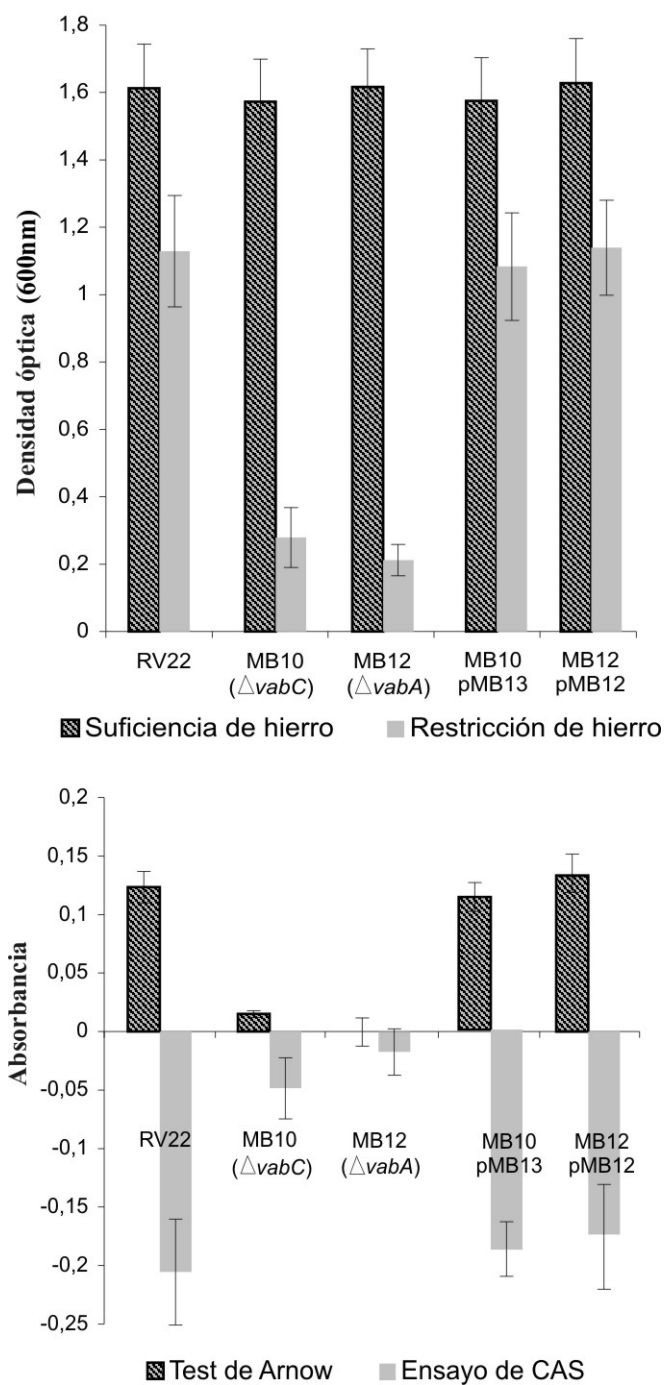


Figura IV. 4: Valores de crecimiento, CAS y Arnow alcanzados tras 22 h de crecimiento por la cepa parental RV22 y las cepas mutantes MB10 y MB12 junto a las mismas cepas complementadas con los genes salvajes.

2.2 El proceso de ensamblaje: *vabE* y *vabF*

En la síntesis de sideróforos de tipo catecol, el DHBA debe ser seleccionado y activado por una 2,3-dihidrobenzoato-AMP ligasa. El resto de componentes serán seleccionados, activados e incorporados al sideróforo en formación por una o varias NRPS. La acción secuencial de las diferentes proteínas determinará la estructura final del sideróforo (Walsh *et al.*, 1990; Earhart, 1996). La secuencia de *vabE* de RV22 es idéntica al denominado *angE* cromosómico (*angE_{ch}*) descrita en la cepa 775 del serotipo O1. *angE_{ch}* codifica una 2,3-dihidrobenzoato-AMP ligasa funcional capaz de complementar la delección del *angE* plasmídico, por lo que es necesario un doble mutante *AngE_{ch}-AngE* para interrumpir la síntesis de anguibactina (Alice *et al.*, 2005). Por otro lado, *VabF* podría constituir la NRPS responsable del ensamblaje final del sideróforo ya que en sus 2835 aminoácidos alberga 7 dominios catalíticos conservados capaces de constituir, por sí solos, un completo mecanismo de síntesis (Tabla IV.5).

Tabla IV.5: Predicción de dominios presentes en las proteínas *VabE*, *VabB* y *VabF*.

Dominio (aa inicio, aa fin)	Valor E
VabE (541 aa)	
Adenilación (56, 469)	3.4e-97
VabB (286 aa)	
Isocorismatasa (26, 205)	2,00E-84
ArCP (219, 284)	2.1e-06
VabF (2835 aa)	
Condensación (15, 313)	1.3e-08
Adenilación (493, 904)	3.9e-122
PCP (995, 1058)	4.8e-06
Condensación (1537, 1833)	1.4e-44
Adenilación (2010, 2418)	1.1e-155
PCP (2510, 2574)	6.8e-13
Tioesterasa (2600, 2823)	1.1e-26

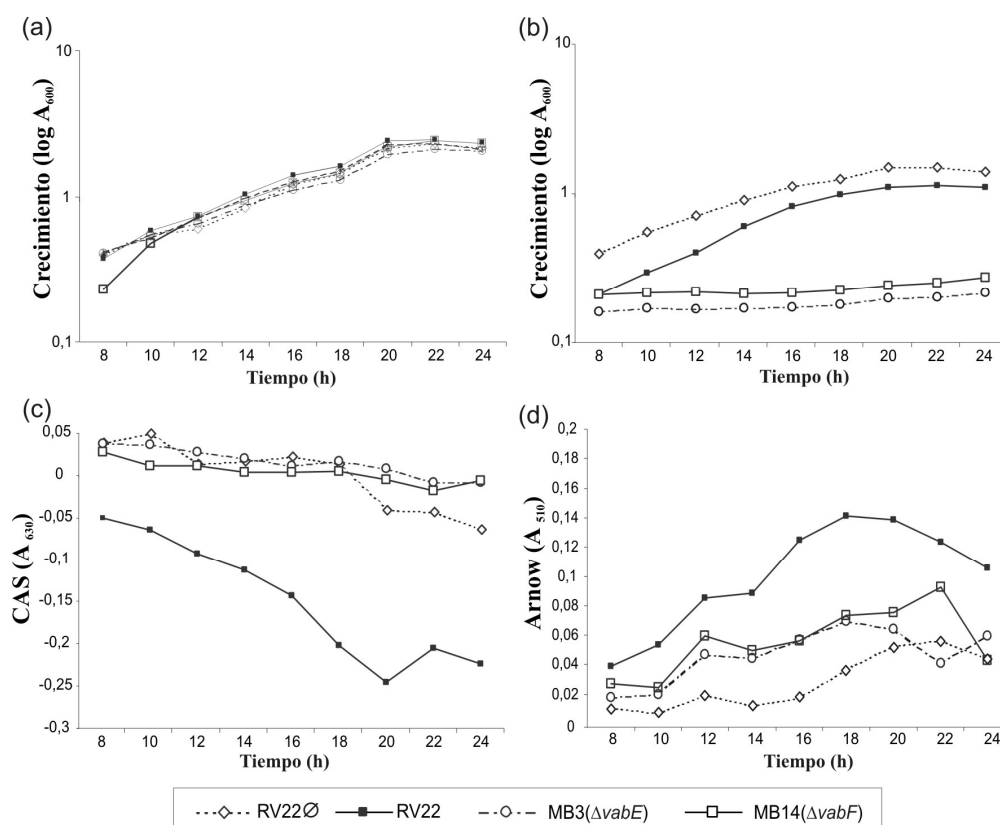


Figura IV.5: Crecimiento en condiciones de (a) disponibilidad y (b) restricción de hierro, (c) producción de sideróforo (CAS) y (d) producción de DHBA (Arnow) de las cepas mutantes MB3 y MB14 y de la cepa RV22 de *V. anguillarum*. Ø indica el crecimiento de RV22 sin añadir quelante o fuente de hierro alguna.

Para determinar la relación funcional de *vabE* y *vabF* con la síntesis de vancrobactina, se construyeron los mutantes MB3 ($\Delta vabE$) y MB14 ($\Delta vabF$) y se analizaron sus fenotipos. Como se ve en la Figura IV.5b, ambos mutantes son incapaces de crecer en déficit de hierro, mientras que el crecimiento en condiciones de disponibilidad de hierro no se ve afectado (Figura IV.5a). Cuando se evaluó la producción de sideróforo, se observó que ésta se suprime en ambos casos, lo que demuestra que existe una relación funcional, ya que la falta de crecimiento está motivada por la pérdida de síntesis de vancrobactina (Figura IV.5c). Estos resultados son comparables con los obtenidos previamente con los mutantes de *vabA*, *vabB* y *vabC*. Al analizar el contenido en DHBA de los sobrenadantes (test de Arnow) se comprobó cómo ambos mutantes, aún sin alcanzar cotas significativas de crecimiento, son capaces de producir DHBA (se mantienen en el 50%) (Figura IV.5d). La producción de DHBA en los mutantes MB3 ($\Delta vabE$) y MB14 ($\Delta vabF$) se verificó al utilizar la cepa *enb-7* de *S. enterica* como cepa indicadora en bioensayos (Tabla IV.4). Los resultados muestran que ambos

mutantes fueron capaces de promover el crecimiento de *enb-7* pero no de *enb-1*. La cepa *enb-7* es deficiente en la producción de DHBA, pero si se le suministra este compuesto es capaz de sintetizar enterobactina y por tanto crecer en condiciones de déficit de hierro. Su crecimiento en el bioensayo demuestra la producción de DHBA por los mutantes MB3 y MB14.

Para comprobar que los fenotipos se debían al efecto derivado de la delección de los genes estudiados, se procedió a complementar los mutantes con los genes silvestres. En este caso ni *vabE* ni *vabF* se localizan junto a sus promotores, por lo que se decidió complementar la delección de *vabF* ampliando la región amplificada de forma que contuviese su promotor; debido a esto el gen *vabH* se incluye en la construcción utilizada para complementar este gen. Al complementar la cepa MB14 ($\Delta vabF$) con el gen y promotor parental (*vabF*) se recuperó tanto la capacidad de crecer en déficit de hierro como los parámetros de producción de sideróforo, siendo su fenotipo comparable al de la cepa silvestre (Figura IV.6).

Todos estos resultados respaldan la hipótesis de que *vabE* y *vabF* constituyen dos NRPS relacionadas con la síntesis de vancrobactina. Estas proteínas actúan una vez que se han sintetizado los componentes del sideróforo y participan en el proceso de ensamblaje. Cuando se interrumpe la síntesis de vancrobactina en el proceso de ensamblaje, los componentes que forman su estructura se acumulan. Esto es lo que sucede en los mutantes MB3 ($\Delta vabE$) y MB14 ($\Delta vabF$), en los que hemos demostrado la acumulación de DHBA. Aunque en el *cluster* de genes *vab* no están presentes otros miembros de la familia de las NRPS, como todavía desconocíamos la estructura química de la vancrobactina, no se podía descartar la intervención de alguna otra enzima.

2.3 Determinación de la estructura química de la vancrobactina

Como hemos visto, VabE y VabF son miembros de las NRPS e intervienen en la síntesis de vancrobactina. La función catalítica de esta familia de proteínas se caracteriza por estar directamente relacionada con su organización modular (Crosa & Walsh, 2002). Para adquirir la máxima información referente a la composición y estructura del sideróforo, se procedió al análisis de los dominios catalíticos presentes en estas proteínas. De forma paralela a estos

trabajos se intentó aislar, a partir de sobrenadantes obtenidos al crecer la cepa RV22 en condiciones de déficit de hierro, fracciones con alto contenido en vancrobactina. Utilizando una metodología basada en técnicas de fraccionamiento, HPLC y bioensayos se consiguió aislar vancrobactina pura que se utilizó posteriormente para determinar su estructura química (apartado 2.3.2). El estudio de los dominios catalíticos presentes en VabE, VabB y VabF sirvió como apoyo a las técnicas de análisis químico a la hora de predecir la naturaleza del sideróforo.

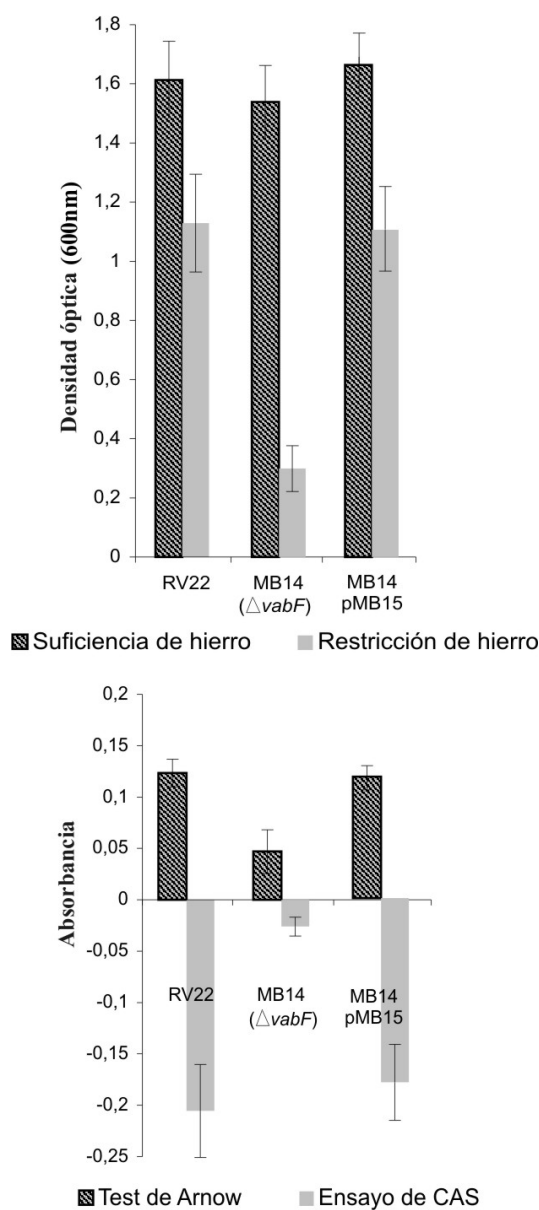


Figura IV. 6: Valores de crecimiento, CAS y Arnow alcanzados tras 22 h de crecimiento por la cepa parental RV22 y la cepa mutante MB14 ($\Delta vabF$) y la cepa mutante complementada con el gen salvaje (MB14 (pMB15)).

2.3.1 Organización modular de VabE, VabB y VabF

Estudiando las NRPS que intervienen en la biosíntesis de un compuesto dado, se puede determinar de forma bastante exacta su composición y estructura. Con este objetivo se analizó la presencia de dominios catalíticos, organización y especificidad de sustrato de las proteínas VabE, VabB y VabF.

La predicción de dominios (Tabla IV.5) muestra que VabE está formado por un único dominio de adenilación (A) y que VabB es una enzima bifuncional que interviene en dos etapas diferentes de la síntesis, ya que contiene un dominio transportador de grupos arilo (ArCP) además del dominio isocorismato liasa que, como hemos demostrado, participa en la síntesis de DHBA. Por tanto, VabE-VabB constituían el módulo de iniciación con estructura A-ArCP que iniciaría el proceso de ensamblaje de la vancrobactina (Figura IV.7).

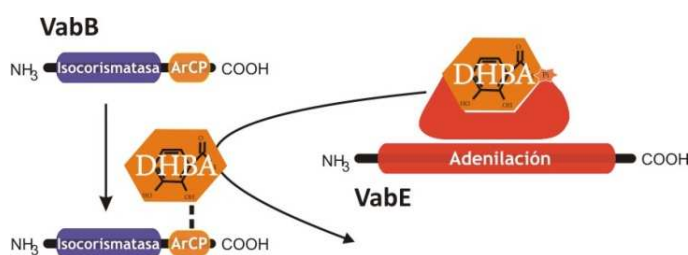


Figura IV.7: Módulo de iniciación formado por las proteínas VabE y VabB.

Por otro lado, VabF contiene siete dominios catalíticos que constituyen dos módulos: un módulo de elongación (VabF módulo 1) con estructura C-A-PCP en posición N-terminal (dominios de condensación - adenilación - transportador de grupos peptídico); y un módulo de terminación de estructura C-A-PCP-TE en posición C-terminal (dominios de condensación - adenilación - transportador de grupos peptídico - tioesterificación) (Tabla IV.5). Existen razones para afirmar que se trata de dominios completamente funcionales, pues se han localizado los motivos catalíticos de cada uno de ellos (Tabla IV.6).

Tabla IV.6: Motivos conservados de los dominios catalíticos de VabB, VabE y VabF. En el dominio de adenilación el motivo catalítico es el 3. En los dominios de condensación (C), tioesterasa (TE) y transportador (ArCP o PCP) se marca en negrita el aminoácido catalítico.

Adenilación	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4	Motivo 5
A_VabB	Y S Y Q N L T M R G I K P V L A L V A F F Q L S G G T T G T P K L P V A H Q V F G M A E				
A1_VabF	W T F D A F L R A G A I Y L P I D V A Y I I F T S G S T G H P K G F D A S N F Y G P T E				
A2_VabF	F T Y Q A L I E C G A A Y L P L D A A Y L L Y T S G S T G N P K G F D V S N L Y G P T E				
Consenso	L T Y x E L L K A G x A Y V P L D L A Y x x Y T S G S T G x P K G F D x S N x Y G P T E				
	S	L I	T		

Adenilación	Motivo 6	Motivo 7	Motivo 8	Motivo 9	Motivo 10
A_VabB	G L L M T R G P Y T I R G Y Y Y I T G D R G R E K D Q I N R G G E K I A A E V E L A E F K I P V G K V N K				
A1_VabF	G E L Y L S G A G L A K G Y L Y R T G D L G R C D H Q I K I R G F R I E L G D V E L P D Y M Q P N G K I D R				
A2_VabF	G E L Y L A G E G L A I G Y F Y R T G D V G R S D D Q I K I R G Q R V E L G E I G L P A H M V P N G K L D K				
Consenso	G E L x I x G x G V A R G Y L Y R T G D L G R x D x Q V K I R G x R I E L G E I E L P x Y M I P N G K V D R	K			L

Condensación	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4	Motivo 5	Motivo 6
C1_VabF	I G T Q Q G I W F A G V D S L H C H Y Y H H I D V D G F S Q Q A Y D F W A A G A V V N V L P V H Q M Y D A E					
C2_VabF	L P L Q E G L L F Q R H P Q L L A R F A H H L V V D G W S Q R D K T V A T P Q I G L F S N T V H D E L G L G					
Consenso	S x A Q x R L W x L R H E x L R T x F M H x I S D G W S Y x D F A V W I G x F V N T Q C x R H Q D Y P F E					
	M Y		V	Y	L A	N V

Liberación	Motivo funcional
TE_VabF	H L L G Y S T G G I V
Consenso	G Y S x G
	H

Transportador	Motivo funcional
ArCP_VabB	D G V D V D E K L T F L G L D S I R A V T L F E S W R
PCP1_VabF	S D V G M S D D F F N L G G D S I S A M S L G T R L R
PCP2_VabF	E T L F A D D D F L T L G G H S L L A M K L A D I R

Aunque los datos anteriores proporcionan información acerca de la función catalítica de estas proteínas, para deducir la estructura de la vancrobactina es necesario predecir su sustrato. Con este objetivo se analizó la especificidad de los dominios de adenilación presentes en VabE y VabF, ya que éstos son los principales responsables de la especificidad de las NRPS. Como primera aproximación se aplicó el código no ribosómico (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis *et al.*, 2000). Este procedimiento se basa en determinar la combinación de aminoácidos presentes en las diez posiciones que delimitan la cavidad interna de unión a sustrato o *substrate binding pocket*. Para localizar estas diez posiciones se alinearon los dominios de adenilación de las proteínas VabE y VabF con el dominio de adenilación de GrsA, que participa en la síntesis de la gramicidina de *Bacillus subtilis*. Tras el alineamiento, se consultó el código no ribosómico.

Tabla IV.7: Posiciones que determinan sustrato en los dominios de adenilación. En cursiva se muestra la determinación de sustrato según el código no ribosómico.

	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517
GrsA	D	A	W	T	I	A	A	I	C	K
VabE-(A)	P	L	P	A	Q	G	V	V	N	K
DHBA/Salicilato	<i>P</i>	<i>L</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>K</i>
VabF-(A1)	D	A	W	D	L	G	F	V	D	K
?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
VabF-(A2)	D	V	W	H	F	S	L	V	D	K
Serina	<i>D</i>	<i>V</i>	<i>W</i>	<i>H</i>	<i>L</i>	<i>S</i>	<i>L</i>	<i>I</i>	<i>D</i>	<i>K</i>

El resultado obtenido se muestra en la Tabla IV.7. Según el código no-ribosómico el sustrato de VabE sería DHBA o salicilato. La determinación de la especificidad de VabE-(A) se aplica a modo de control, pues parece claro que el sustrato activado por VabE es DHBA y no salicilato. Esta afirmación se fundamenta en la gran similitud de VabE con numerosas 2,3-dihidrobenczoato-AMP ligasas y en que la vancrobactina es un sideróforo de tipo catecol positivo en el test de Arnou (Lemos *et al.*, 1988; Conchas *et al.*, 1991).

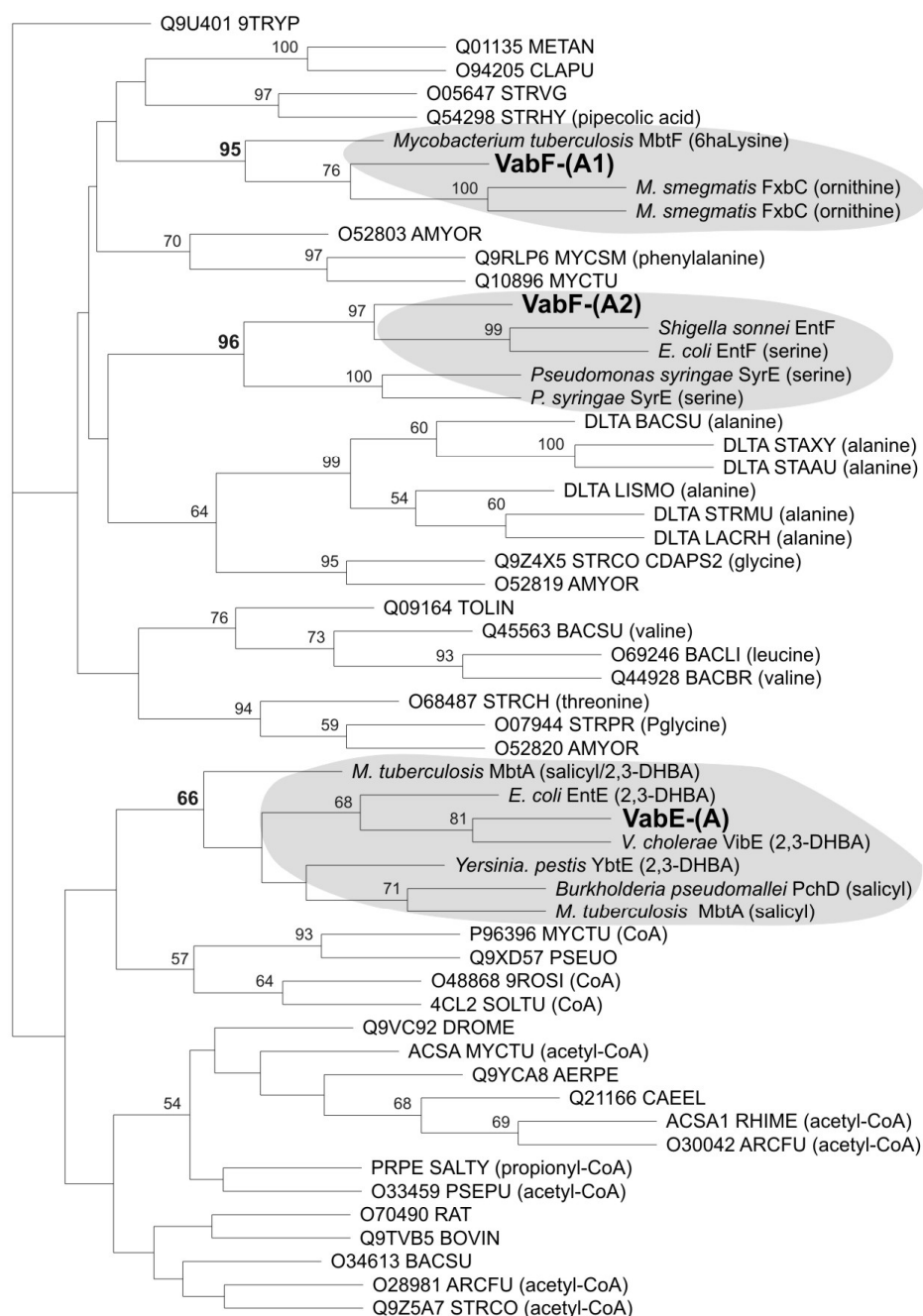
VabF contiene dos dominios de adenilación, que nombraremos como VabF-(A1) (N-terminal) y VabF-(A2) (C-terminal). El código no ribosómico sólo nos permite asignar la serina como sustrato para el dominio VabF-(A2), pues la combinación de aminoácidos presentes en el dominio VabF-(A1) no corresponde con ninguna asignación conocida (Tabla IV.7). El resultado obtenido para VabF-(A2) concuerda con el alto grado de homología entre el

extremo C-terminal de VabF y EntF de *E. coli*, una NRPS que incorpora serina a la enterobactina en formación (Reichert *et al.*, 1992).

Hasta el momento, la vancrobactina estaría constituida por DHBA, un compuesto indeterminado y serina. Para asegurar estas asignaciones y predecir la naturaleza del componente indeterminado, se procedió al análisis filogenético de la región que constituye el *Substrate binding pocket* de los dominios de adenilación (residuos comprendidos entre la posición 190 y 331 de GrsA) (Stachelhaus *et al.*, 1999). Se alinearon los *Substrate binding pocket* de nuestras proteínas, VabE-(A), VabF-(A1) y VabF-(A2), junto a 410 dominios de adenilación obtenidos de las bases de datos UniProt/TrEMBL/SWISS-PROT (Boeckmann *et al.*, 2003; Apweiler *et al.*, 2004). Con el alineamiento obtenido, se realizó un árbol filogenético de *Neighbour-Joining* siguiendo la metodología descrita por Di Vincenzo *et al.* (2005). Posteriormente se realizó una extensa búsqueda bibliográfica para conocer el sustrato incorporado por cada uno de los dominios que se agrupan en la misma rama o en ramas cercanas a VabE-(A), VabF-(A1) y VabF-(A2). En la Figura IV.8 se muestra una reducción del árbol inicial, donde se ven nuestros dominios agrupados junto a aquellos en los que se conoce el sustrato. VabE-(A) se agrupa en una rama con los dominios de adenilación que incorporan DHBA o salicilato (valores de *bootstrap* de 66%). Esta rama se divide en dos subgrupos: un subgrupo está compuesto por VabE-(A) junto a proteínas con actividad DHBA-AMP ligasa (*bootstrap* del 68%) como EntE de *E. coli* y VibE de *V. cholerae*; el otro subgrupo contiene proteínas con actividad Salicilato-AMP ligasa. Aunque los valores de *bootstrap* no son demasiado altos, confirma la asignación realizada mediante el código no ribosómico. Por otro lado, VabF-(A2) se agrupó junto a dominios con especificidad por serina (*bootstrap* de 96%) y comparte rama con los dominios de adenilación presentes en EntF de *E. coli* y *Shigella sonnei*, así como con los dominios A1 y A2 de la proteína SyrE de *Pseudomonas syringae*. Con este método se pudieron confirmar los sustratos utilizados por VabE-(A) y VabF-(A2) (DHBA y Serina), pero la especificidad que más nos interesó predecir es la de VabF-(A1).

Como se muestra en la Figura IV.8, VabF-(A1) se agrupa, con valores de *bootstrap* de 95% o superior, junto a dominios con especificidad por compuestos como la ornitina o lisina. Los dominios de adenilación con afinidad por compuestos de cadenas hidrocarbonadas

largas con carga positiva como la ornitina, lisina y arginina forman lo que se considera una misma familia de *substrate binding pocket* (Rausch *et al.*, 2005); así, un aminoácido o derivado de éstos de cadena larga con carga positiva y larga sería el tercer constituyente de la vancrobactina.



10

Figura IV.8: Árbol filogenético *Neighbour-Joining*, construido a partir de las secuencias de aminoácidos de 56 dominios de adenilación con especificidad por sustrato conocido. Los dominios más cercanos a VabE (VabE-(A)) y VabF (VabF-(A1) y VabF-(A2)) se nombran con especie, proteína y sustrato entre paréntesis.

2.3.2 Determinación química

Para la determinación de la estructura química de la vancrobactina se obtuvieron sobrenadantes ricos en sideróforo a partir de cultivos de la cepa RV22 de *V. anguillarum*. Posteriormente, se realizó un trabajo exhaustivo de aislamiento y purificación en el que se exploraron numerosas vías metodológicas hasta obtener una fracción pura de vancrobactina (ver materiales y métodos). Este trabajo se realizó en colaboración con el grupo de investigación del profesor Carlos Jiménez, del Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña. Nuestro trabajo se ciñó a suministrar los sobrenadantes iniciales y a la determinación de la actividad química y biológica de las fracciones obtenidas durante los procesos de purificación. Disponer de una hipótesis biológica de la estructura de la vancrobactina, a partir del estudio de los genes de síntesis, fue muy útil en el proceso de aislamiento y en la interpretación de los datos referentes a la estructura química.

Con el extracto de vancrobactina pura obtenido, el grupo de investigación del profesor Carlos Jiménez procedió a la determinación estructural del compuesto. Con las diferentes técnicas utilizadas se calculó un peso molecular para la vancrobactina de 398,1658 g/mol, valor que equivale a una fórmula química de $C_{16}H_{24}N_5O_7$, que se corresponde con N-[N'-(2,3-dihidroxibenzoil)-arginil]-serina (Figura IV.9) (Soengas *et al.*, 2006).

Los datos de la estructura de la vancrobactina, junto con los obtenidos del análisis de mutantes por delección de cada uno de los genes, demuestran que VabE, VabB y VabF forman los módulos necesarios para el ensamblaje del sideróforo a partir de DHBA, arginina y serina. Por tanto, en el *cluster* de genes *vab* están presentes todas las funciones enzimáticas necesarias para su síntesis, quedando descartada la intervención de otros genes.

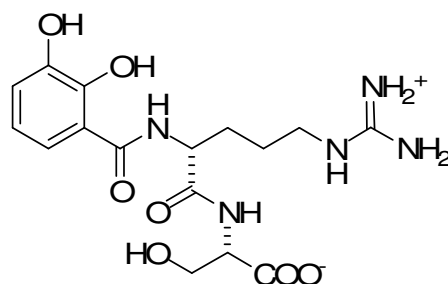


Figura IV.9: Estructura de la vancrobactina (N-[N'-(2,3-dihidroxibenzoil)-D-arginil]-L-serina).

2.3.2.1 Determinación del estereoisómero natural

Una vez determinada la estructura, el siguiente objetivo que se planteó fue la determinación de la quiralidad de la vancrobactina natural, ya que se ha demostrado que en el reconocimiento por los microorganismos la quiralidad y la forma del complejo hierro-sideróforo es de suma importancia. Se sabe también que la reducción del espacio conformacional aumenta la eficiencia del enlace con el metal (Stack *et al.*, 1993).

Mediante síntesis química se obtuvieron las tres posibles configuraciones funcionales de los aminoácidos arginina y serina (LL, LD y DL) y a continuación se estudiaron los espectros de absorción y la actividad biológica de cada uno de ellos. En el análisis electroforético, el estereoisómero DL sintetizado químicamente mostró el mismo tiempo de retención que la vancrobactina nativa (Figura IV.10), lo que demuestra que la conformación absoluta de la vancrobactina nativa es N-[N'-(2,3-dihidroxibenzoil)-D-arginil]-L-serina (Soengas *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque la vancrobactina en configuración DL mostró una mayor actividad biológica, los tres estereoisómeros (LL, LD y DL) fueron capaces de promover eficientemente el crecimiento de *V. anguillarum* RV22 en condiciones de déficit de hierro (Figura IV.11). De estos resultados se deduce que la quiralidad no es una cuestión limitante en el reconocimiento del complejo hierro-vancrobactina por parte del receptor de la vancrobactina en *V. anguillarum*.

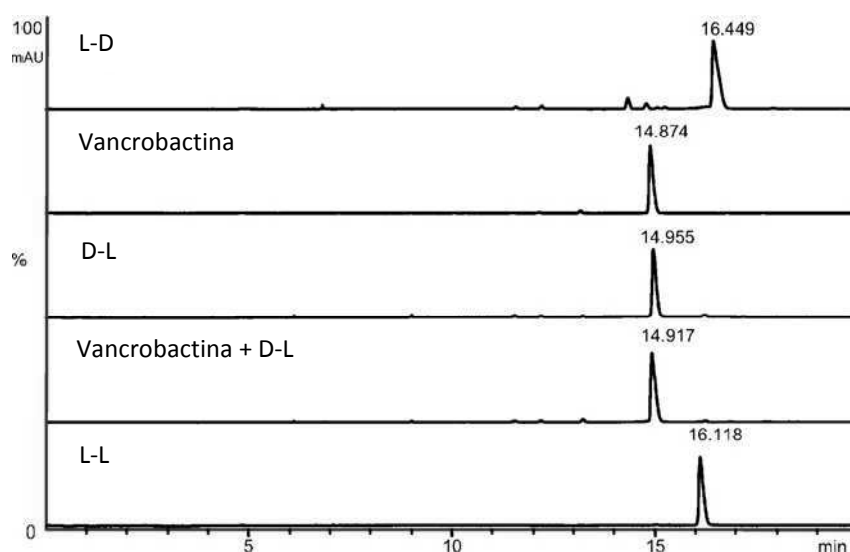


Figura IV.10: Cromatograma y tiempos de retención obtenidos con el extracto de vancrobactina purificada a partir de sobrenadantes y los isómeros sintéticos ensayados.

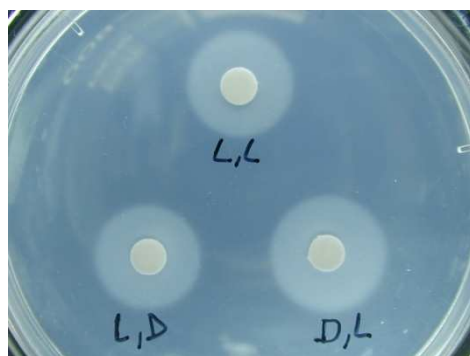


Figura IV.11: Prueba de actividad biológica de isómeros sintéticos de vancrobactina en configuración LL, LD y DL, referida a los aminoácidos que la forman, arginina y serina.

2.4 Activación de los dominios transportadores: *vabD*

En las NRPS, el sustrato activado por el dominio de adenilación se transfiere a la cisteína terminal del grupo fosfopanteteinil (4'-PP), que actúa como cofactor de los dominios transportadores (ArCP y PCP). Durante el proceso de síntesis, estos dominios anclan los grupos arilo o peptídilo de la estructura en formación a la NRPS. Por tanto, para que VabB y VabF sean funcionales, es necesaria la activación previa de sus dominios ArCP y PCP. En la activación de los dominios transportadores participa una proteína con actividad fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), que une covalentemente el grupo fosfopanteteinil a un residuo de serina conservado (Figura IV.12).

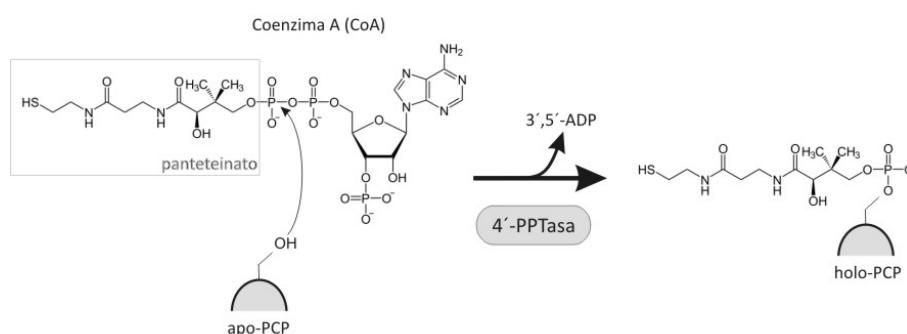


Figura IV.12: Reacción catalizada por la fosfopanteteinil transferasa.

Según la relación de homologías, *vabD* podría codificar una proteína con actividad PPTasa (Tabla IV.2), de tal manera que la delección de este gen implicaría la pérdida total de actividad de la NRPS. Para demostrar esta hipótesis se construyó el correspondiente

mutante $\Delta vabD$ (MB67) y se analizó, mediante la realización de curvas de crecimiento y pruebas de CAS y Arnow, su capacidad de crecimiento y producción de sideróforo.

Bajo condiciones de disponibilidad de hierro este mutante no vio afectada su capacidad de crecimiento. Sin embargo, en condiciones de déficit de hierro se evidenció que esta cepa era incapaz de crecer (Figura IV.13b). Si el fenotipo está provocado por la inactivación de las NRPS, es predecible la acumulación de DHBA. Los valores obtenidos utilizando las pruebas de CAS y Arnow respaldaron esta hipótesis. Mientras que el ensayo de CAS fue negativo, el test de Arnow fue positivo (Figura IV.13c y IV.13d). Así, parece que el mutante MB67 sintetiza con normalidad el DHBA, pero no es capaz de producir el sideróforo final a partir de sus precursores: DHBA, arginina y serina. Estas observaciones fueron respaldadas por los resultados obtenidos con los bioensayos (Tabla IV.8), pues MB67 ($\Delta vabD$) promueve el crecimiento del mutante MB10 ($\Delta vabC$). Esto se debe a que el mutante MB67, incapaz de sintetizar vancrobactina, acumula DHBA, que puede ser utilizado por la cepa MB10 para sintetizar vancrobactina y así sustentar su propio crecimiento (conviene recordar que MB10, aunque no sintetiza DHBA, tiene intacta la maquinaria de ensamblaje). Los bioensayos muestran además que MB67 ($\Delta vabD$) no puede promover el crecimiento de MB14 ($\Delta vabF$), que puede utilizar la vancrobactina como fuente de hierro (Tabla IV.8), observación que confirma que el mutante $vabD$ es incapaz de sintetizar el sideróforo final. La fosfopanteteinil transferasa descrita en *V. cholerae*, VibD, también es esencial para la síntesis de vibriobactina, además, en esta especie se ha comprobado que el gen homólogo descrito en *E. coli*, *entD*, es capaz de complementar su función cuando se introduce en un plásmido en un mutante de *vibD* de *V. cholerae* (Wyckoff *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos demuestran que *vabD* es un gen esencial para la producción de vancrobactina, ya que su pérdida inactiva el proceso de ensamblaje del sideróforo realizado por las NRPS VabE, B y F. Todos estos datos sugieren que VabD es la PPTasa necesaria para la activación de los dominios transportadores presentes en VabB y VabF (ArCP y PCP respectivamente).

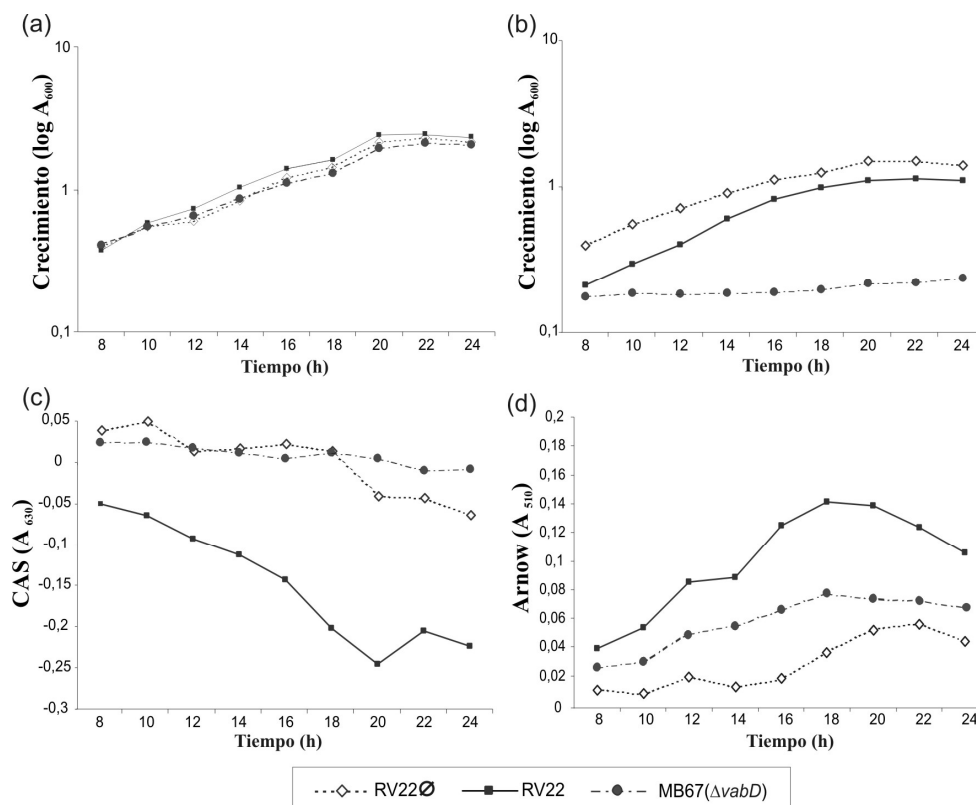


Figura IV.13: Crecimiento en condiciones de (a) disponibilidad y (b) restricción de hierro, (c) producción de sideróforo (CAS) y (d) producción de DHBA (Arnow) de la cepa mutante MB67 y de la cepa RV22 de *V. anguillarum*. \emptyset indica el crecimiento de RV22 sin añadir quelante o fuente de hierro alguna.

Tabla IV.8: Resultados de los experimentos de alimentación cruzada utilizando los mutantes MB54 ($\Delta vabG$), MB67 ($\Delta vabD$), MB10 ($\Delta vabC$), y MB14 ($\Delta vabF$) como cepas indicadoras. La cepa RV22 de *V. anguillarum* se utilizó como cepa control.

Cepa ensayada	Capacidad para promover el crecimiento de:			
	MB54 ($\Delta vabG$)	MB67 ($\Delta vabD$)	MB10 ($\Delta vabC$)	MB14 ($\Delta vabF$)
RV22	+	+	+	+
MB54 ($\Delta vabG$)	NA	(+)	(+)	(+)
MB67 ($\Delta vabD$)	+	NA	+	-
MB10 ($\Delta vabC$)	+	-	NA	-
MB14 ($\Delta vabF$)	+	-	+	NA

NA. No aplicable

(+) Crecimiento débil

2.5 Aumento de la disponibilidad de corismato: *vabG*

El gen *vabG* codifica una posible DAHP sintasa (Tabla IV.2), enzima clave en la regulación de la ruta del siquimato, que es el punto de partida de numerosas rutas de metabolitos secundarios (Hodgson, 2000). La estricta regulación de la ruta del siquimato hace que no haya apenas corismato disponible para alimentar al metabolismo secundario. Esta regulación se ejerce tanto a nivel transcripcional (Pittard *et al.*, 2005) y traduccional (Yanofsky, 2000), como por regulación alostérica por producto final (Panina *et al.*, 2001; Pittard *et al.*, 2005). En las Gamma-proteobacterias se han identificado tres isoenzimas de la DAHP sintasa: AroF, AroG y AroH, que responden por retroalimentación negativa a la concentración final de un determinado aminoácido (tirosina, fenilalanina y triptófano respectivamente) (Camakaris & Pittard, 1974; Panina *et al.*, 2001; Panina *et al.*, 2003), ajustando de forma precisa las cantidades del producto final y de sus intermediarios. La vancrobactina contiene en su estructura una molécula de 2,3-DHBA, compuesto que engarza la síntesis de sideróforos con el metabolismo general ya que, como hemos visto, el 2,3-DHBA deriva del corismato, uno de los intermediarios de la ruta del siquimato. Esta es la razón por la que se necesitarían isoenzimas específicas de DAHP sintasas destinadas a la producción de este tipo de metabolitos secundarios. Estas isoenzimas se escaparían de la regulación general de la ruta del siquimato y aumentarían la disponibilidad de corismato bajo condiciones específicas.

Para comprobar la relación funcional de *vabG* con la producción de sideróforo en *V. anguillarum* se construyó un mutante por delección de dicho gen. MB54 ($\Delta vabG$) está afectado de forma drástica en su capacidad de crecimiento en condiciones de déficit de hierro, mientras que los niveles de crecimiento en condiciones de disponibilidad de hierro son similares a los de la cepa parental RV22 (Figura IV.14a y IV.14b). La producción de sideróforo y DHBA se analizó mediante la prueba de CAS y el test de Arnow. Los resultados muestran que en los sobrenadantes de MB54 ($\Delta vabG$) no se hallan estos compuestos en cantidades significativas (Figura IV.14c y IV.14d).

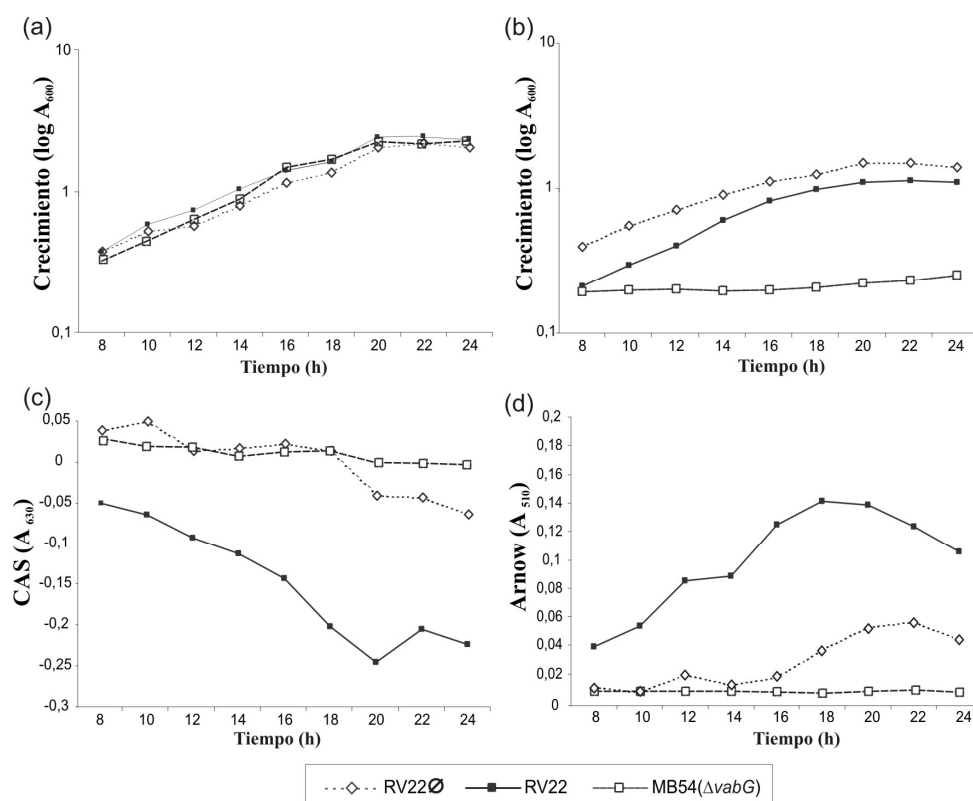


Figura IV.14: Crecimiento en condiciones de (a) disponibilidad y (b) restricción de hierro, (c) producción de sideróforo (CAS) y (d) producción de DHBA (Arnov) de la cepa mutante MB54 y de la cepa RV22 de *V. anguillarum*. \emptyset indica el crecimiento de RV22 sin añadir quelante o fuente de hierro alguna.

Para establecer si la reducción en la producción de vancrobactina es total o parcial y si es posible acotar con más exactitud la función de este gen, se realizaron experimentos de alimentación cruzada, utilizando como cepas indicadoras diferentes mutantes de los genes *vab* (Tabla IV.8). Sorprendentemente, se observó que la síntesis de DHBA no está totalmente suprimida. MB54 ($\Delta vabG$) es capaz de inducir bajos niveles de crecimiento del mutante MB14 ($\Delta vabF$), que sólo puede utilizar vancrobactina como fuente de hierro. De modo similar, MB54 induce el crecimiento del mutante MB10 ($\Delta vabC$), que puede utilizar tanto vancrobactina como DHBA.

El hecho de que MB54 ($\Delta vabG$) sintetice cantidades traza de vancrobactina, confirma la hipótesis de que VabG es la DAHP sintasa encargada de proporcionar la cantidad extra de corismato necesario para alimentar la ruta de síntesis del sideróforo, si bien la existencia de isoenzimas del metabolismo general (homólogos de AroF, AroG y AroH) imposibilita que el bloqueo de la síntesis de sideróforos sea total. Además, recientemente se han evidenciado

interconexiones entre las rutas de síntesis de aminoácidos y las específicas de sistemas de captación de hierro. En *Bacillus subtilis* se han encontrado 11 genes relacionados con la síntesis de aminoácidos, que aumentan su expresión más de un 40% durante el crecimiento en condiciones de privación de hierro. Estos genes intervienen asimismo en la producción de precursores del sideróforo bacilibactina (treonina, glicina o DHBA) (Miethke *et al.*, 2006).

Aunque ya se han encontrado otras DAHP sintetas incluidas en *clusters* de síntesis de sideróforos (Osorio *et al.*, 2006), este es el primer caso donde se evidencia una relación funcional entre genes de síntesis de sideróforos y las DAHP sintetas. Más adelante, cuando describamos la regulación del sistema, intentaremos aportar más datos a este respecto.

2.6 Modelo de biosíntesis de la vancrobactina

En apartados anteriores hemos expuesto los resultados obtenidos en cuanto a la estructura de la vancrobactina y a la función de los genes que intervienen en su síntesis (*vabABCEFD*). Con todo ello, y teniendo en cuenta las rutas de biosíntesis propuestas para sideróforos del mismo tipo, como la enterobactina o la anguibactina (Crosa & Walsh, 2002), proponemos una posible ruta de síntesis (Figura IV.15a y IV.15b).

La síntesis de un sideróforo de tipo catecol comienza con la conversión de corismato en DHBA. Aunque desde un punto de vista estricto, las DAHP sintetas no se considerarían parte de esta ruta, VabG demostró ser esencial para el crecimiento de la cepa RV22 en condiciones de déficit de hierro. Una vez dispuesto el exceso de corismato necesario, comenzaría la síntesis del sideróforo propiamente dicha. De acuerdo con los datos presentados en apartados anteriores y con las funciones asignadas a los genes *entC*, *B* y *A* de *E. coli* (Walsh *et al.*, 1990; Earhart, 1996), en *V. anguillarum* la isocorismato sintasa, isocorismatasa y 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato dehidrogenasa necesarias para la síntesis de DHBA las codifican *vabC*, *B* y *A* respectivamente (Figura IV.15a).

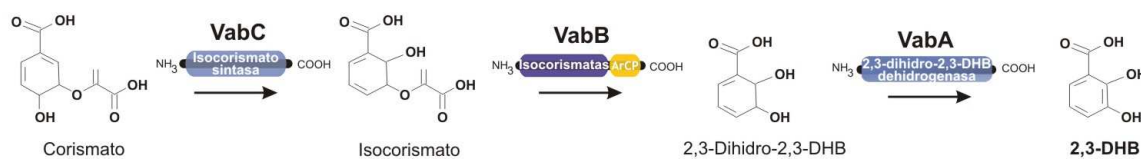
Tras la síntesis del DHBA, es necesaria la intervención de una 2,3-dihidrobencato-AMP ligasa para activar dicho compuesto y comenzar el proceso de ensamblaje (Crosa & Walsh, 2002). La proteína codificada por *vabE* es la que cumple esta función; selecciona y activa por adenilación el DHBA recién sintetizado y lo deja unido al dominio transportador (dominio ArCP) de VabB. VabB es una enzima bifuncional, que interviene en la biosíntesis de

DHBA con su dominio isocorismatasa y en el ensamblaje del sideróforo con su dominio ArCP. De este modo, VabE y VabB formarían el módulo de iniciación de la cadena de ensamblaje por NRPS de la vancrobactina (Figura IV.15b).

Los dominios de adenilación de las NRPS son los encargados de seleccionar el amino- o carboxi- ácido a incorporar (Crosa & Walsh, 2002). En la activación de DHBA ya ha actuado el primero de ellos, VabE. A partir de los datos estructurales mencionados anteriormente, se deduce que el dominio VabF-(A1) activaría un residuo de arginina y lo uniría mediante un enlace tioéster al dominio PCP de su módulo. Posteriormente, el dominio de condensación catalizaría la unión entre el DHBA anclado al ArCP de VabB y la arginina unida al primer PCP de VabF. El resultado de la acción de este módulo es un 2,3-dihidroxibenzoil-arginina anclado en el VabF-(PCP1) (Figura IV.15b).

Después de la primera reacción de elongación actuaría el segundo módulo de VabF, que es precisamente la región que guarda más homología con EntF de *E. coli* (Reichert *et al.*, 1992). El dominio VabF-(A2) activaría una serina y la incorporaría a la estructura en formación por medio del dominio de condensación (VabF-(C2)). Finalmente, el monómero de 2,3-dihidroxibenzoil-arginina-serina (vancrobactina) se liberaría en el citoplasma gracias a la acción del dominio tioesterasa (TE) (Lautru & Challis, 2004).

a



b

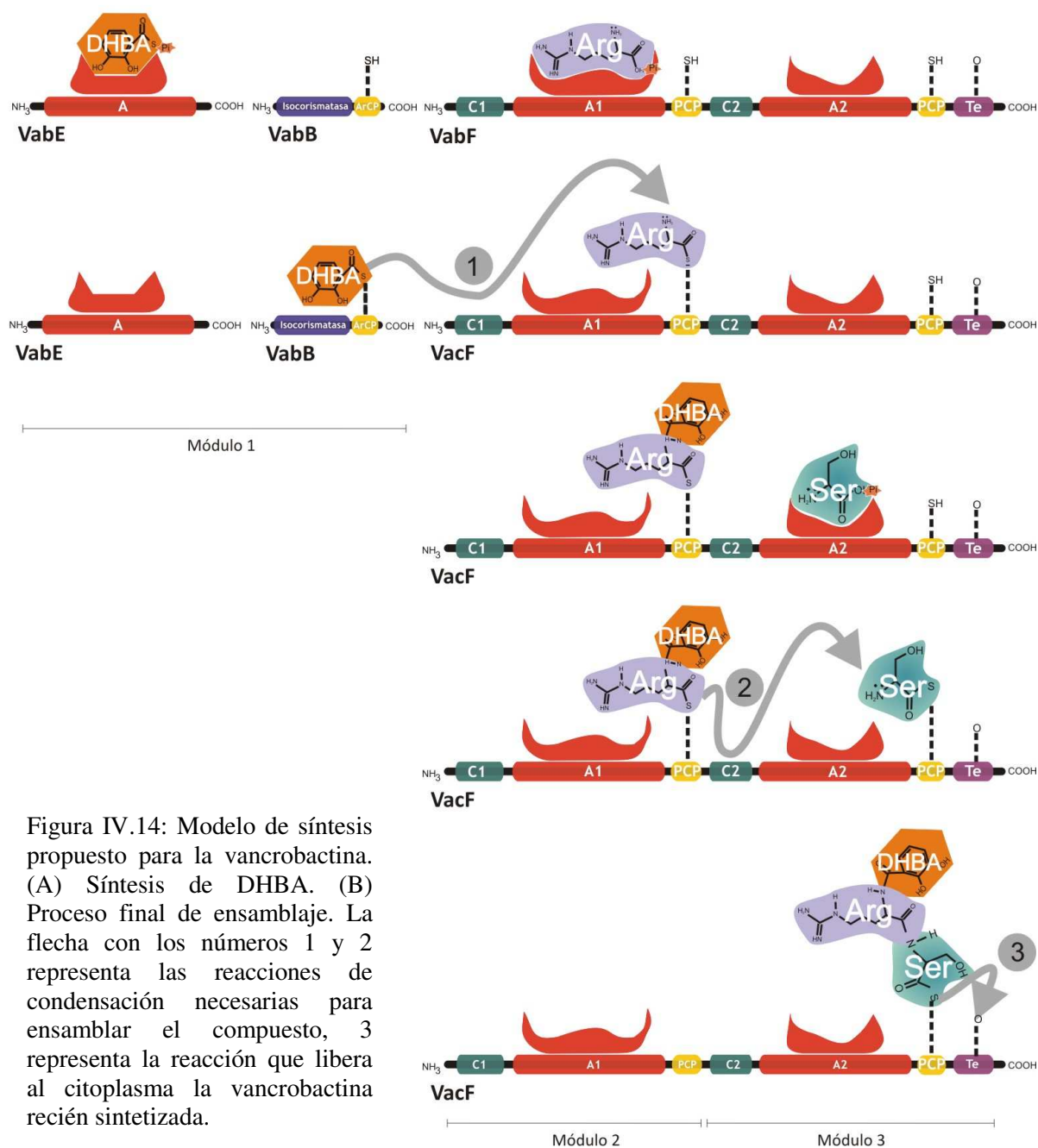


Figura IV.14: Modelo de síntesis propuesto para la vancomicina. (A) Síntesis de DHBA. (B) Proceso final de ensamblaje. La flecha con los números 1 y 2 representa las reacciones de condensación necesarias para ensamblar el compuesto, 3 representa la reacción que libera al citoplasma la vancomicina recién sintetizada.

3. Transporte de hierro-vancrobactina

El *cluster* de la vancrobactina incluye dos *orfs*, *fvtA* y *orf13*, que codificarían proteínas homólogas a miembros de la familia de receptores dependientes de TonB, concretamente receptores de sideróforos de tipo catecol, como la enterobactina o vibriobactina, descritos en diferentes especies de vibrios (Tabla IV.3). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de FvtA y ORF13 con homólogos descritos previamente en otros vibrios permite localizar los motivos conservados que definen a esta familia de receptores. En el extremo N-terminal se localiza el motivo conservado que participa en la interacción del receptor con la proteína TonB. Este motivo está presente en ambas proteínas, FvtA (DETVVVGE) y ORF13 (METLVVTAS) y se denomina caja TonB (Los residuos subrayados corresponden con los aminoácidos conservados en todos los receptores de tipo TonB) (Lundrigan & Kadner, 1986; Gudmundsdottir *et al.*, 1989; Nau & Konisky, 1989). Además, la mayoría de los receptores poseen una secuencia conservada en el extremo C-terminal que interviene en el correcto ensamblaje del receptor en la membrana externa (Funahashi *et al.*, 2002). Esta secuencia está presente en ORF13 y FvtA, así como en otros receptores dependientes de TonB que median la captación de sideróforos o grupo hemo descritos en una gran variedad de vibrios (Tabla IV.9). Por todo ello consideramos que dichos genes podrían intervenir en el proceso de transporte de vancrobactina al interior celular.

3.1 Determinación del receptor de vancrobactina

Tanto *fvtA* como *orf13* forman parte del *cluster* de genes *vab* por lo que ambos son candidatos a codificar el receptor de membrana externa que transporte el complejo hierro-vancrobactina. Para evaluar la relación funcional de cada uno de los posibles receptores con el transporte del sideróforo, se siguió la misma metodología que para los genes anteriores. Obtuvimos mutantes individuales y combinados de cada uno de ellos y se evaluó la capacidad de estos mutantes para crecer en condiciones de déficit de hierro comparándola con la cepa salvaje y el mutante de biosíntesis MB11 ($\Delta vabB$).

Tabla IV.9: Comparación de los 11 aminoácidos del extremo C-terminal de FvtA y ORF13 con otros receptores de sideróforos y grupo hemo de tipo TonB descritos en vibrios. Esta región representa una barrera de laminas- β anfipática con residuos hidrofóbicos en las posiciones 1 (preferentemente una fenilalanina), 3, 5, 7 y 9 y una arginina en posición 11 desde el extremo C-terminal.

aa	Motivo	Proteína	Especie
653	R T F G I V A D Y Q F	FvtA	<i>V. anguillarum</i>
640	R R Y W F A I N T S F	ORF13	<i>V. anguillarum</i>
716	R T V M L S A T A D F	FatA	<i>V. anguillarum</i>
716	R N Y A I T A K Y E F	HuvA	<i>V. anguillarum</i>
668	A E F M L S Y G Y Q F	PsuA	<i>V. alginoliticus</i>
692	R S Y T L D L N Y Q F	PvuA	<i>V. alginoliticus</i>
690	R S A V L S A N Y R W	FhuA	<i>V. cholerae</i>
642	R R Y W L G L D I A F	IrgA	<i>V. cholerae</i>
683	R N F G I T A K Y E F	HutA	<i>V. cholerae</i>
677	R M I G A S V Q L N F	ViuA	<i>V. cholerae</i>
702	R N Y N I S V K Y E F	HupA	<i>V. vulnificus</i>
677	R M I G A S L Q L N F	VuuA	<i>V. vulnificus</i>
695	R T F T L N Y Q V K F	IutA	<i>V. orientalis</i>

Al crecer los mutantes MB84 ($\Delta fvtA$), MB70 ($\Delta orf13$) y MB90 ($\Delta fvtA\text{-}\Delta orf13$) en condiciones de exceso de hierro no hubo diferencias significativas entre ellos ni con la cepa parental RV22 (Figura IV.16). Sin embargo, en condiciones restrictivas de hierro (CM9 suplementado con 10 μ M de EDDA) el mutante defectivo MB84 ($\Delta fvtA$) fue incapaz de crecer, siendo su fenotipo equiparable al fenotipo del mutante no productor de vancrobactina (MB11). Por el contrario, el mutante MB70 ($\Delta orf13$) no vio afectada en modo alguno su capacidad de crecimiento. El doble mutante MB90 ($\Delta fvtA\text{-}\Delta orf13$) muestra un nivel de afección similar a los mutantes sencillos MB94 ($\Delta fvtA$) y MB11 ($\Delta vabB$).

Al analizar la producción de sideróforo se comprobó que los fenotipos de las cepas MB84 y MB90 no estaban relacionados con la incapacidad de producir vancrobactina. De hecho en el mutante $\Delta fvtA$ el nivel de producción de sideróforo, analizado mediante el test de CAS, aumentó un 50% respecto a la cepa salvaje y al mutante MB70 ($\Delta orf13$). A una DO_{600} de 0,6 la cepa salvaje y la MB70 ($\Delta orf13$) alcanzaron valores de -0,2, mientras que MB84 ($\Delta fvtA$) alcanzó valores de -0,3 o inferiores (valores más negativos indican mayor producción de sideróforos). Con el mutante de biosíntesis MB11 ($\Delta vabB$), utilizado a modo de control

negativo bajo estas mismas condiciones, se obtuvieron valores de tan sólo -0,015. El aumento en la producción de sideróforo detectable en los sobrenadantes de los mutantes $\Delta fvtA$ (MB84 y MB90) puede atribuirse por tanto a la acumulación extracelular de vancrobactina.

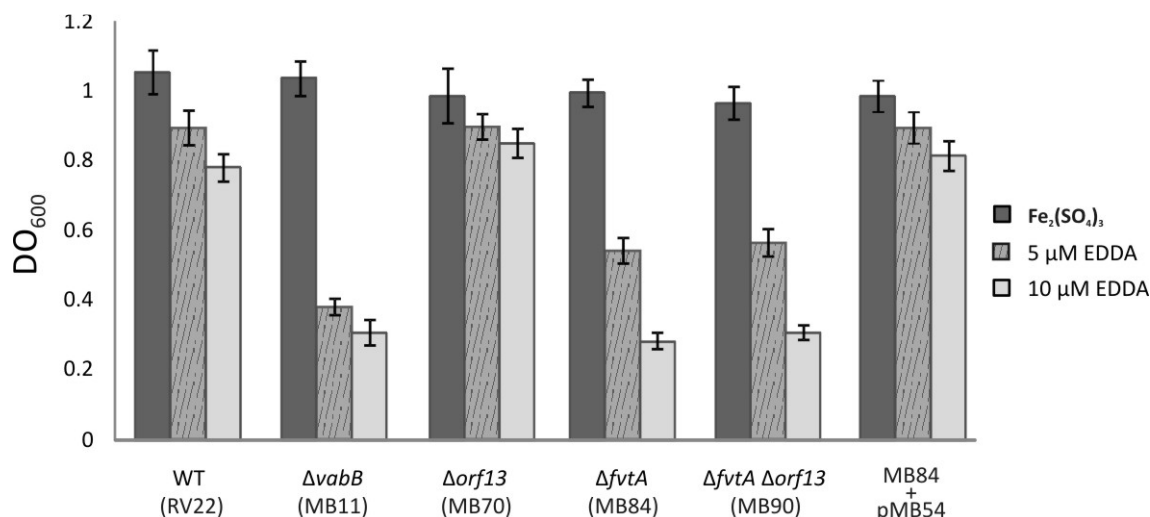


Figura IV.16: Crecimiento de RV22 y mutantes de transporte MB70, MB84 y MB90, comparados con la cepa no productora de vancrobactina MB11 ($\Delta vabB$), en condiciones de exceso y déficit de hierro. Se muestra también el crecimiento del mutante MB84 complementado con el gen *fvtA* salvaje.

Tenemos que resaltar que al utilizar con las cepas defectivas en el gen *fvtA* las condiciones de déficit de hierro empleadas en el análisis de los genes de biosíntesis (CM9 con 5 μM de EDDA) se observan fenotipos intermedios si los comparamos con el fenotipo de la cepa no productora de vancrobactina MB11 (Figura IV.16). Este fenotipo intermedio se podría atribuir a la existencia de una segunda vía de entrada ineficiente que, al aumentar la producción de vancrobactina, sea capaz de sustentar cierto crecimiento. Por este motivo, se decidió aumentar la concentración de EDDA a 10 μM (Figura IV.16). Con esta concentración la cepa salvaje creció con total normalidad mientras que las cepas MB84 y MB90, ambas mutantes $\Delta fvtA$, y MB11 presentaron fenotipos equivalentes.

Al complementar la cepa MB84 ($\Delta fvtA$) con una copia intacta del gen *fvtA* y su promotor (plásmido pMB54) se recuperó la capacidad de crecer en déficit de hierro (Figura IV.16). Estos resultados evidencian que FvtA desempeña un papel clave en la internalización de hierro-vancrobactina, mientras que el ORF13 no parece estar relacionado con el transporte de este sideróforo.

En las bacterias Gram-negativas, la mayoría de los receptores relacionados con la captación de hierro tienen un peso molecular de 70 KDa a 80 KDa. Para visualizar el producto de la expresión de *fvtA* y *orf13*, se migraron extracciones de proteínas de membrana externa en un gel SDS-PAGE realizadas tras cultivar los diferentes mutantes en condiciones de déficit y en disponibilidad de hierro. En la Figura IV.17 vemos cómo en el rango de tamaños esperado (70 KDa – 80 KDa) se inducen en condiciones de déficit de hierro cuatro bandas. Una de ellas (marcada con una flecha), está presente en todas las cepas menos en los mutantes defectivos en el gen *fvtA*, cepas MB84 ($\Delta fvtA$) y MB90 ($\Delta fvtA\text{-}\Delta orf13$). Esta banda reaparece en la cepa MB84 complementada con el plásmido pMB54 (portador de promotor y *fvtA* completos), por tanto esta banda podría corresponderse con el producto de expresión del gen *fvtA* (la predicción del peso molecular de FvtA es de 78 KDa). Por el contrario, el patrón de bandas del mutante $\Delta orf13$ (MB70) es idéntico al de la cepa parental, además el doble mutante $\Delta fvtA\text{-}\Delta orf13$ (MB90) presenta el mismo patrón que el mutante sencillo $\Delta fvtA$ (MB84) (la predicción del peso molecular de ORF13 es 71 KDa). Este resultado, junto con los resultados negativos al intentar detectar por RT-PCR el transcrito de *orf13* (Figura IV.26, pag. 142), sugiere que este gen no se está expresando. Las otras bandas inducidas en déficit de hierro, con tamaños cercanos a FvtA, pueden ser atribuidas a otros receptores de membrana externa, como el receptor de hemo HuvA (ca. 79 kDa) (Mouriño *et al.*, 2004) o receptores de sideróforos exógenos como el ferricromo (ver apartado IV 7.2).

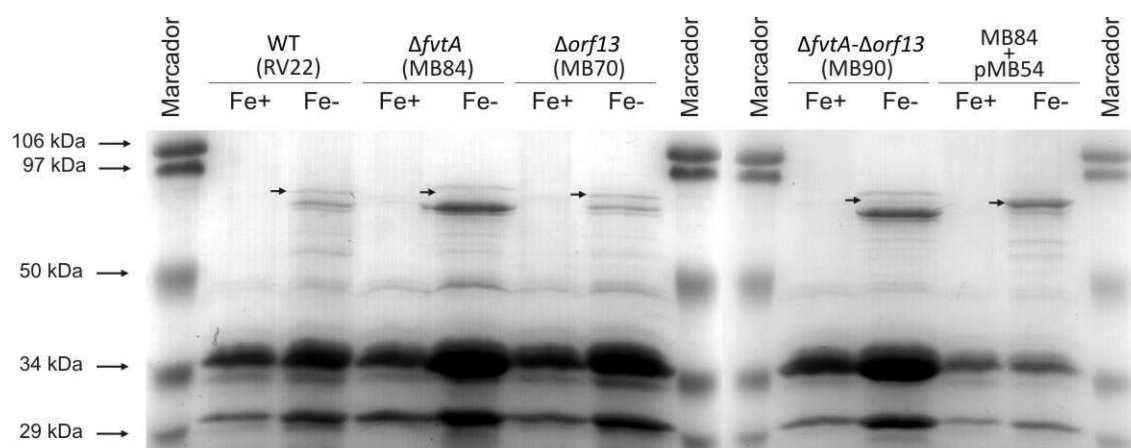


Figura IV.17: Proteínas de membrana externa en condiciones de suficiencia y déficit de hierro.

De los datos aportados, se puede concluir que en el proceso de transporte hacia el citoplasma del complejo hierro-vancrobactina el gen *fvtA* desempeña un papel crucial. Sin embargo nada podemos deducir sobre la función de *orf13*, ya que parece que éste no se está expresando al menos en las condiciones estudiadas.

4. Otros elementos del sistema

La utilización de un sistema de sideróforos requiere, además de un mecanismo de síntesis, la existencia de una maquinaria específica para secretar el sideróforo al medio extracelular, recuperar el complejo hierro-sideróforo y finalmente poder utilizar el hierro captado. En los próximos apartados se describirán las proteínas codificadas en el *cluster* de genes *vab* relacionadas con estos procesos.

4.1 Secreción de vancrobactina: VabS

VabS es una proteína de 437 aa homóloga a transportadores de membrana relacionados con resistencia a fármacos, que pertenecen a la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) dependientes de la fuerza protón-motriz (Tabla IV.2). Concretamente VabS sería un miembro de la familia de transportadores con 12 motivos transmembrana que delimitan un poro central (12-TMS) (Paulsen *et al.*, 1996). En relación a la secreción de sideróforos, la proteína mejor caracterizada es EntS (P43) de *E. coli*, codificada por un gen que forma parte del operón de la enterobactina (Furrer *et al.*, 2002). Utilizando el programa TMHMM (Tusnady & Simon, 2001) se realizó la predicción de los motivos transmembrana de VabS. Al compararlos con los presentes en EntS, se detectó la ausencia del TMS décimoprimer en la proteína VabS (Figura IV.18). La ausencia de este motivo transmembrana se ha descrito en otros miembros de esta familia, por ejemplo en el exportador de sideróforos de *Acinetobacter baumannii* denominado P45 (Dorsey *et al.*, 2003).

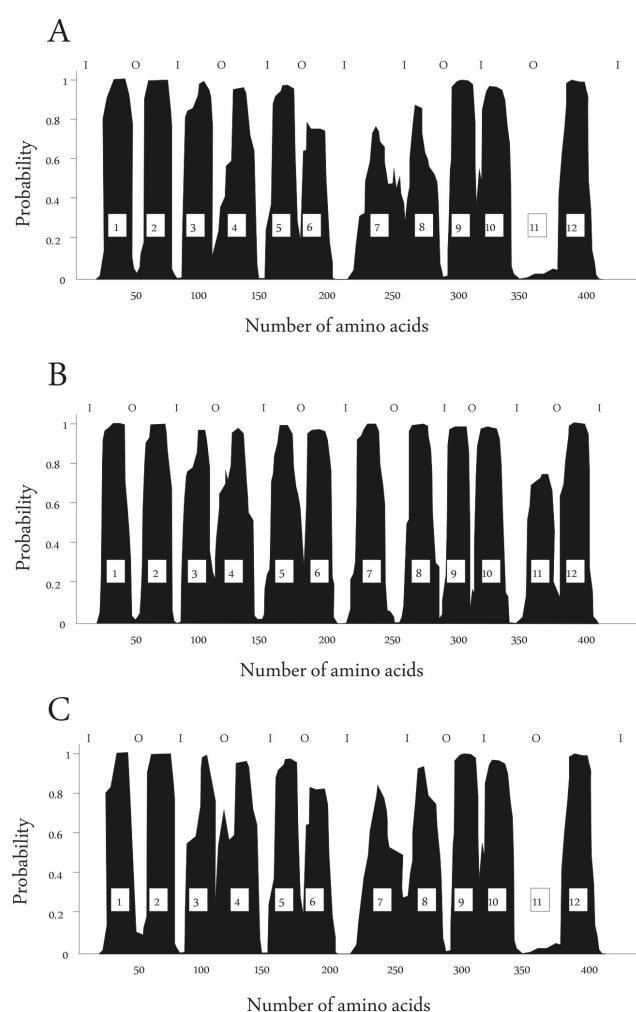


Figura IV.18: Análisis comparativo de los motivos transmembrana de VabS de *V. anguillarum* (A), EntS de *E. coli* (B) y P45 de *A. baumani* (C). Las columnas negras representan los motivos transmembrana. I (inside) y O (outside) indican la localización de esa región de aminoácidos respecto a la membrana celular.

La predicción de las estructuras transmembrana permitió localizar en VabS los motivos conservados que caracterizan a este grupo de transportadores, en especial los motivos que definen la familia (motivo A, B, C y D2) (Tabla IV.10). El motivo A, localizado entre los segmentos transmembrana (TMS) 2 y 3, está muy conservado en todas las familias de MFS (Pao *et al.*, 1998) y desempeña un papel importante en el proceso de apertura y cierre del canal (Jessen-Marshall *et al.*, 1995). El motivo B situado en el TMS 4 se ha relacionado con el transporte de protones (Paulsen *et al.*, 1995). El motivo C, localizado en el TMS 5, está presente sólo en los transportadores de resistencia a fármacos y se relaciona con la direccionalidad del transporte (Griffith *et al.*, 1992). El motivo D2 localizado en el TMS 1 tiene una función indeterminada. Por último se localizó el motivo G presente sólo en las proteínas de esta familia de 12 TMS; es una duplicación C-terminal del Motivo C que se

localiza en el TMS 11. Ambos motivos cumplirían funciones similares aunque esto no ha sido comprobado (Paulsen *et al.*, 1995).

Tabla IV.10: Motivos conservados característicos de los exportadores de la familia MFS con 12 motivos transmembrana.

Proteína	Motivo D2	Motivo A	Motivo B	Motivo C	Motivo G
P43	LGLLGVAVPVQI	GVLADRYERKKVI	IYLLGLWDGFSAS	GSVISPMIGGLL	GDAIGAA
VabS	LGMTTVAVPIQI	GVLADKYDRRLI	LYILSVWDGFFGA	GMVLSPAIGGLL	GDSIGAL
Consenso	LGxxxxx*PVxP	GxLaDrxGrKxxI	LxxxRxxqGxgaa	gxxxGPxxGGxL	GxxxGPL

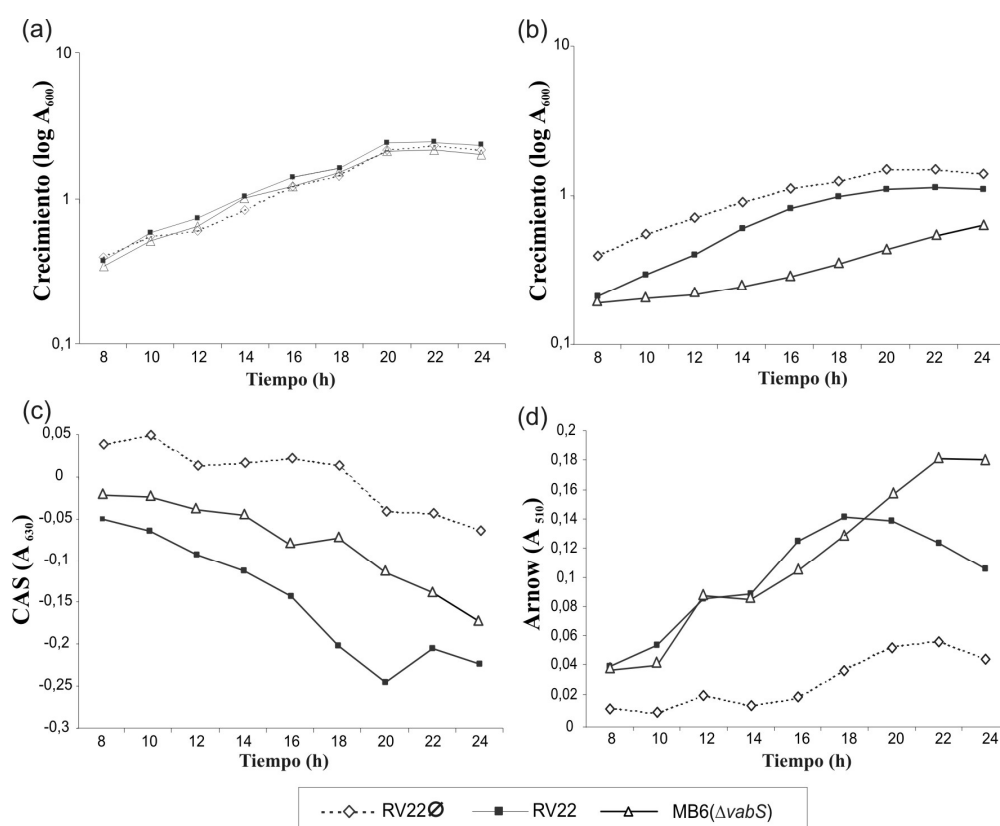


Figura IV.19: Crecimiento en condiciones de (a) disponibilidad y (b) restricción de hierro, (c) producción de sideróforo (CAS) y (d) producción de DHBA (Arnow) de la cepa mutante MB6 ($\Delta vabS$) y de la cepa RV22 de *V. anguillarum*. \emptyset indica el crecimiento de RV22 sin añadir quelante o fuente de hierro alguna.

La cepa defectiva para el gen *vabS* (MB6) mostró una severa reducción en su capacidad de crecer en déficit de hierro. A diferencia del fenotipo descrito en los mutantes de genes de biosíntesis analizados anteriormente, la cepa MB6 ($\Delta vabS$) mantiene el 50% de la tasa de crecimiento original (Figura IV.19). Los niveles de producción de sideróforo cuantificados en el mutante (por el método de CAS) se acercan a los detectados en la cepa salvaje, sin

embargo los valores del test de Arnow llegan a ser sensiblemente superiores (Figura IV.19c y IV.19d). De estos resultados se deduce que el mutante MB6 ($\Delta vabS$) mantiene los niveles de actividad quelante de hierro a base de aumentar significativamente la producción de vancrobactina.

Un fenotipo similar al de la cepa MB6 ($\Delta vabS$) se ha descrito en *E. coli entS*⁻ (Furrer *et al.*, 2002). Este mutante es incapaz de secretar eficientemente enterobactina, lo que reduce su tasa de crecimiento en condiciones de déficit de hierro. El crecimiento de *E. coli entS*⁻ se sustenta en la utilización de uno de los productos de degradación de la enterobactina, el 2,4-dihidroxibenzoil-serina (DBS) a modo de sideróforo. En la célula, una vez terminado el proceso de síntesis de enterobactina, ésta se secreta por medio de un mecanismo de transporte específico. Si se produce una acumulación intracelular la enterobactina quelaría el hierro endógeno desencadenándose un proceso de muerte celular. Para evitar esto, Fes (esterasa de enterobactina) hidroliza el complejo hierro-enterobactina intracelular generando trímeros, dímeros y monómeros lineales de DBS (Furrer *et al.*, 2002). Estos compuestos atraviesan la membrana celular, y aunque tienen menor afinidad por el hierro, pueden ser utilizados como sideróforos alternativos al mantener cierta actividad quelante de hierro; además, se transportan eficientemente por el receptor de enterobactina (Hantke, 1990; Rabsch *et al.*, 2003). Una situación análoga podría suceder en el mutante MB6 ($\Delta vabS$). Si esta hipótesis es correcta, un precursor o producto de degradación de la vancrobactina estaría actuando a modo de sideróforo alternativo. Los valores de CAS y Arnow obtenidos con el mutante MB6 ($\Delta vabS$) se corresponden con la existencia de un compuesto de tipo sideróforo pero de menor eficiencia, alcanzándose así valores parecidos de actividad quelante de hierro (CAS) a base de aumentar su cantidad (Arnow), sustentándose así cierto crecimiento. Esto se refleja en el mutante MB6 en unos valores de CAS equiparables a los de la cepa salvaje pero con un aumento significativo en la producción de DHBA/vancrobactina.

Todos estos resultados indican que *vabS* es necesario para el crecimiento normal de la cepa RV22 en condiciones de déficit de hierro. Analizando la secuencia de aminoácidos de la proteína y el fenotipo del mutante MB6 ($\Delta vabS$) pensamos que su función podría estar relacionada con el proceso de secreción de vancrobactina.

4.2 Utilización del complejo hierro-vancrobactina: VabH

Una vez recuperado el hierro-sideróforo del medio extracelular el Fe^{+3} debe liberarse del sideróforo como paso previo indispensable para su utilización o almacenamiento. Por su similitud con numerosas esterasas de hierro-sideróforo, VabH es la candidata a realizar esta función en el sistema de la vancrobactina. El mutante obtenido al deleccionar *vabH* (MB19) fue incapaz de crecer en déficit de hierro, aunque tanto el test de Arnow como el de CAS dieron reacciones positivas (Figura IV.20). De los resultados obtenidos se deduce que el fenotipo de MB19 no está relacionado con la incapacidad de sintetizar sideróforo, sino que sería una cepa que produce vancrobactina de modo normal pero es incapaz de utilizarla. De hecho se detectó la presencia de vancrobactina en el sobrenadante de este mutante mediante técnicas de espectrometría de masas (HPLC-ESI-TOF).

Al complementar la cepa mutante MB19 (*vabH*) con el plásmido pMB16, que contiene el promotor y el gen *vabH* parental, se recuperaron las tasas de crecimiento y producción de sideróforo (Figura IV.20). Los valores obtenidos con la cepa complementada fueron indistinguibles de la cepa RV22 salvaje, lo que confirma que el fenotipo registrado se debió exclusivamente a la delección del gen *vabH* y no a efectos polares.

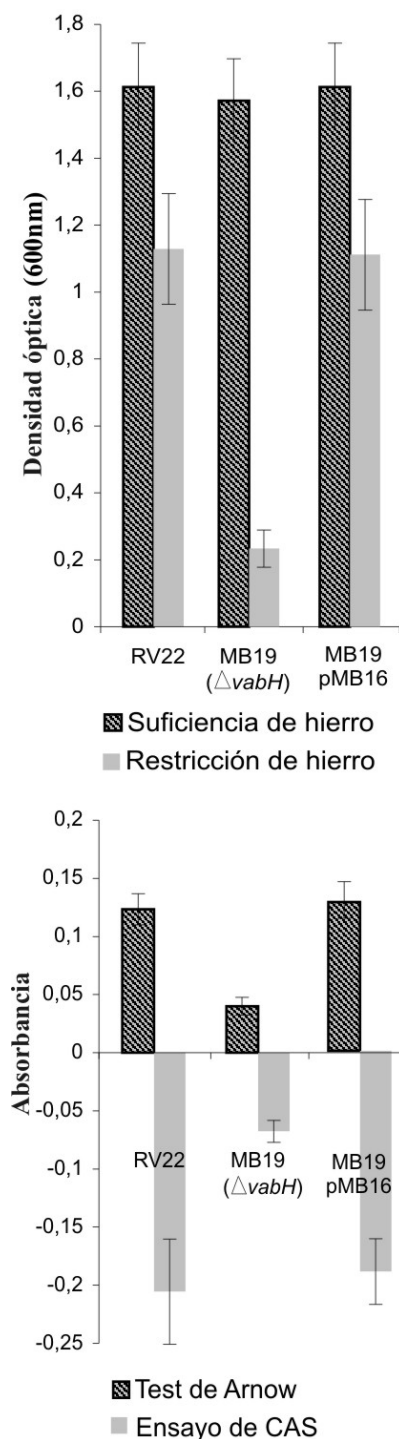


Figura IV. 20: Valores de crecimiento, CAS y Arnow alcanzados tras 20 h de crecimiento por la cepa parental RV22 y la cepa mutante MB19 junto a la cepa mutante complementada con el gen salvaje.

En *E. coli*, el complejo hierro-enterobactina es degradado por una esterasa específica (Fes) (Brickman & McIntosh, 1992; Furrer *et al.*, 2002). La predicción del péptido codificado por *vabH* es una proteína de 401 aa que guarda una similitud del 53% con Fes (Tabla IV.3). Sin embargo otros homólogos descritos no son esenciales para la utilización del hierro, este es el caso de CbsH, relacionada con la degradación de la crisobactina producida por *Erwinia chrysanthemi* (Rauscher *et al.*, 2002). En los procesos de utilización de los hierro-sideróforos suelen participar también reductasas que reducen el Fe^{+3} a Fe^{+2} , haciendo que el sideróforo pierda afinidad por el hierro quedando disponible para su metabolización (Fischer *et al.*, 1990).

El drástico efecto de la mutación de *vabH* en la cepa RV22 sugiere que el proceso de liberación del hierro se produce fundamentalmente por degradación del complejo hierro-vancrobactina, proceso en el que participaría VabH. En el caso concreto de la utilización del complejo hierro-vancrobactina, la acción de ferri-reductasas parece desempeñar un papel secundario, aunque tampoco se puede descartar la participación de este tipo de enzimas, identificadas previamente en *V. anguillarum* RV22 (Mazoy & Lemos, 1996).

4.3 Influencia de VabR sobre la producción de vancrobactina

El gen *vabR* codifica una proteína homóloga a la familia de factores transcripcionales LTTR, típicos de procariotas, que se unen al DNA cuando está presente un coinductor (Schell, 1993). VabR es una proteína de 286 aminoácidos que contiene en su extremo N-terminal la característica estructura de unión al DNA hélice-vuelta-hélice y entre los aminoácidos 61 y 278 un posible dominio de unión a ligando. El mutante por delección de *vabR* (MB53) no muestra, en condiciones de déficit de hierro, deficiencia alguna ni en el potencial de crecimiento ni en la capacidad de síntesis de vancrobactina (Figura IV.21). El posible efecto regulador que pudiese ejercer VabR sobre los demás genes del sistema es un aspecto de sumo interés que se abordará en el apartado dedicado a la regulación.

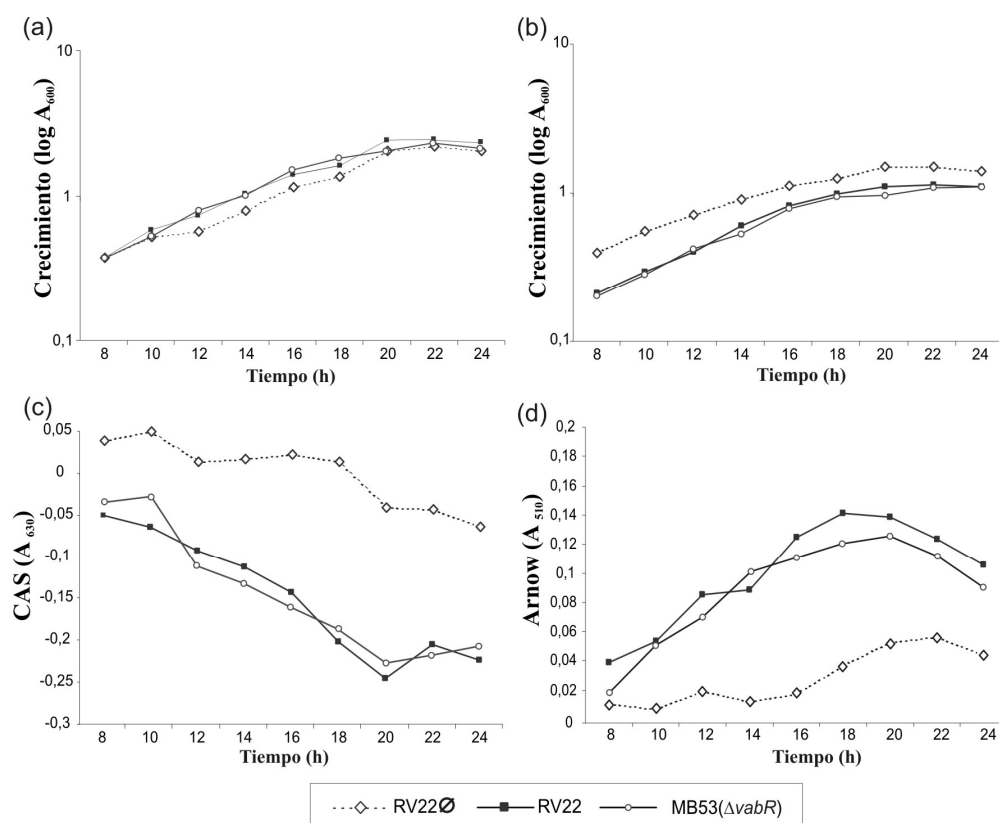


Figura IV.21: Crecimiento en condiciones de (a) disponibilidad y (b) restricción de hierro, (c) producción de sideróforo (CAS) y (d) producción de DHBA (Arnow) de la cepa mutante MB53 ($\Delta vabR$) y de la cepa RV22 de *V. anguillarum*. Ø indica el crecimiento de RV22 sin añadir quelante o fuente de hierro alguna.

4.4 MbtH

Una de las consecuencias de la secuenciación a gran escala es la anotación de gran cantidad de genes de función desconocida. Uno de los primeros miembros de la familia MbtH descritos es el gen *mbtH* que forma parte del *cluster* de biosíntesis de la micobactina, sideróforo producido por *Mycobacterium tuberculosis* (Quadri *et al.*, 1998). Estos genes codifican proteínas pequeños péptidos, de unos 70 aa (Figura IV.22), asociados a NRPS de síntesis de antibióticos y sideróforos que en muchos casos se cotranscriben junto a las NRPS de estos sistemas, estando sujetos a los mismos procesos de regulación. Por ejemplo, *ybdZ* es parte del *cluster* de la enterobactina y se cotranscribe junto a *entH* (*fes*) y *entF* (Pettis & McIntosh, 1987). El *cluster* de genes *vab* contiene un homólogo de esta familia que se localiza entre *vabH* y *vabF* con su misma orientación, por lo que es probable que se cotranscriba junto a ellos. Hay que destacar que todos los miembros de esta familia se han

identificado exclusivamente en bacterias, hasta el momento no se han identificado proteínas tipo MbtH asociadas a NRPS de hongos.

Los datos publicados sobre la función de este tipo de proteínas en los sistemas de biosíntesis son contradictorios. En numerosos casos la participación de los MbtH es determinante en los procesos de síntesis, mientras que en otros estudios los resultados demuestran que no lo son. Estos resultados contradictorios se podrían atribuir a que otros miembros de esta familia complementan su función, de tal manera que para detectar el efecto en una ruta determinada a menudo hay que mutar más de un homólogo. Por ejemplo, CchK y CdaX de *Streptomyces coelicolor* son dos MbtH que ante la ausencia de alguno de ellos complementan la función del otro. Se ha estudiado detenidamente la expresión de ambos genes, encontrándose que se cotranscriben junto a las NRPS que constituyen sus sistemas nativos. CchK participa en la biosíntesis del sideróforo coechelina y sólo se expresa en condiciones de déficit de hierro, mientras que CdaX participa en la biosíntesis de CDA (Antibiótico Dependiente de Calcio) y se expresa sólo al final de la fase exponencial. Cuando uno de ellos no está presente, la generación del producto final de esa ruta se ve condicionada por el patrón de expresión del otro sistema (Lautru *et al.*, 2007).

Según estudios recientes, los MbtH podrían actuar directa o indirectamente como reguladores transcripcionales (Bate *et al.*, 2006) o bien participar en procesos de unión proteína-proteína relacionados con la interacción entre NRPS (*cross-talk*) (Lautru *et al.*, 2007). Todos los MbtH presentan dos residuos de triptófano separados por 19-22 aa, estructura similar a las presentes en proteínas que intervienen en procesos de interacción proteína-proteína, con el dominio W2 (dos triptófanos separados 22-30aa) característico de factores de iniciación de eucariotas, o el dominio WW (dos triptófanos separados 20-30aa) que une proteínas al anclarse a regiones con anillos de prolina (Figura IV.22) (Lautru *et al.*, 2007).

El *cluster* de genes *vab* contiene un único miembro de la familia MbtH. Aunque existen numerosas hipótesis sobre la función de este tipo de proteínas, al no haber realizado estudio alguno, no podemos atribuir ninguna función en el sistema de sideróforos ni en el metabolismo general de *V. anguillarum*.

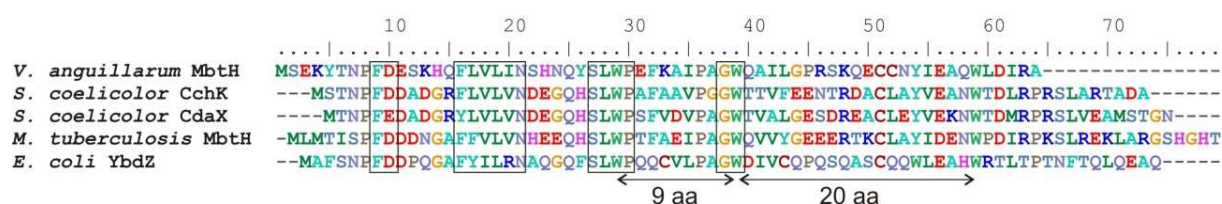


Figura IV.22: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de proteínas caracterizadas como MbtH. Dentro de las cajas se marcan las posiciones conservadas típicas de esta familia. Las flechas señalan los dominios W2 y WW.

5. Distribución del *cluster vab* en *V. anguillarum*

Con la finalidad de conocer el rango de distribución de los genes de biosíntesis, regulación y transporte de la vancrobactina en los diferentes fenotipos y cepas de *V. anguillarum*, se comprobó su presencia en una colección de 33 aislados que representan los diez serotipos más importantes de esta especie (serotipo O1 al O10). Buena parte de las cepas utilizadas de los serotipos O1, O2 y O3 han sido aisladas, a partir de peces con síntomas de vibriosis, en la Unidad de Ictiopatología del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela. La presencia de los genes se comprobó tanto por PCR como por hibridación DNA-DNA mediante *Southern blot*. Los cebadores utilizados para amplificar las regiones internas de cada uno de los genes y para la obtención de las sondas utilizando DNA genómico de la cepa RV22 como molde, se recogen en la Tabla III.4 (ver Materiales y Métodos).

5.1 Presencia de genes *vab* en todos los serotipos de *V. anguillarum*

Los resultados obtenidos muestran que todas las cepas ensayadas contienen los genes *vab*, con la única excepción del gen *vabB*, que está ausente en tres de las cepas del serotipo O3 (PT-4933, 11008 y ATCC4330) (Tabla IV.11). Por tanto, estos datos indican que los genes que codifican el sistema de vancrobactina son ubicuos en *V. anguillarum*, estando presentes en cepas productoras de vancrobactina, pero también en cepas que producen únicamente anguibactina (todas las del serotipo O1 a excepción de 96F). La capacidad de producir sideróforos no está restringida a cepas de los serotipos O1 y O2. Así, se ha descrito con anterioridad que algunas cepas del serotipo O3 también producen un sideróforo de tipo catecol (Muiño *et al.*, 2001). A la vista de nuestros resultados de distribución de los genes

vab, este sideróforo producido por cepas del serotipo O3 podría ser también vancrobactina. Para comprobar esta posibilidad, se obtuvieron sobrenadantes de cultivos de la cepa ET-208 (serotipo O3) en condiciones de déficit de hierro y se sometieron al proceso de purificación utilizado con anterioridad para la purificación de la vancrobactina. Los resultados preliminares obtenidos confirman que esta cepa produce también vancrobactina (Figura IV.23).

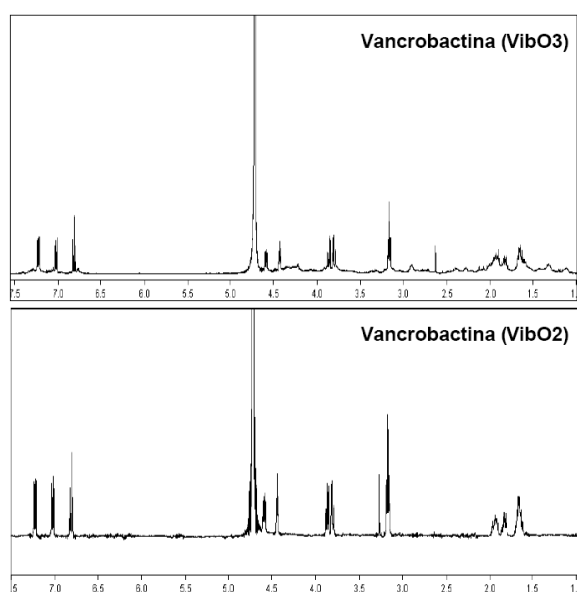


Figura IV.23: Datos de MNR del sideróforo producido por la cepa ET-208 del serotipo O3 (superior) y de la vancrobactina (inferior).

Es destacable el hecho de que otras cepas de *V. anguillarum*, como por ejemplo la mayor parte de las cepas del serotipo O1, no producen vancrobactina, pero sin embargo poseen los genes *vab* en su genoma. Esto abre un interrogante, ¿por qué estas cepas no producen vancrobactina?. La presencia del plásmido pJM1, que codifica los genes necesarios para la síntesis y utilización de anguibactina, parece estar asociada con la ausencia de producción de vancrobactina en las cepas que lo portan. La secuenciación del *cluster* de genes *vab* en *V. anguillarum* 775, cepa modelo en los estudios de anguibactina, mostró que el gen *vabF* está truncado por una secuencia de inserción RS1 (Naka *et al.*, 2008). Nuestros resultados indican que todas las cepas que portan el plásmido pJM1 poseen la misma secuencia de inserción (RS1) (Tabla IV.11), que bloquea la síntesis de vancrobactina al inactivar la NRPS responsable del ensamblaje (VabF). RS1 codifica una proteína 100% homóloga con la RS1 (*orf21*) originalmente descrita en el plásmido pJM1 (Di Lorenzo *et al.*, 2003), lo que implica una probable transposición del plásmido al cromosoma. Los genes de

pJM1 están flanqueados por secuencias de inserción denominadas ISV-A1 y ISV-A2 que forman una estructura de tipo transposón. Estudios recientes han mostrado como ISV-A2 es activa y se transpone con una frecuencia de 7.2×10^{-6} (Liang *et al.*, 2007).

Tabla IV.11: Presencia de los genes de síntesis y transporte de vancrobactina y el elemento móvil RS1 en una colección de cepas de *V. anguillarum* que representan los serotipos O1 a O10.

Cepa	Origen	Genes de vancrobactina										RS1
		vabA	vabB	vabC	vabE	vabF	vabS	vabH	fvtA	orf13		
Serotipo 0 O1												
TM14	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ATCC43305	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SE56.1	<i>Salmo</i> spp, España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SO121.1	<i>Salmo</i> spp, España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
RI33.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SE145.1	<i>Salmo</i> spp, España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
PC933.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
96F	<i>Morone saxatilis</i> , USA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
R82	<i>Scophthalmus maximus</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
775	<i>Oncorhinchus kisutch</i> , USA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Serotipo 0 O2												
ATCC14181	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
PC640.1	<i>Solea solea</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
CA3.1/04	<i>Scophthalmus maximus</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
AZ215.1	<i>Solea solea</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
CA13.1	<i>Pollachius pollachius</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
ACC4.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , Portugal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
PC628.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
ATCC43306	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
RV22	<i>Scophthalmus maximus</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
43F	<i>Morone saxatilis</i> , USA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
CA1.1/04	<i>Solea solea</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Serotipo 0 O3												
PT-493	<i>Plecoglossus altivelis</i> , Japón	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	
11008	<i>Dicentrarchus labrax</i> , Francia	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	
ATCC43307	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Dinamarca	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	
ET-208	<i>Anguilla japonica</i> , Japón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Serotipo 0 O4												
RPM41.11	<i>Scophthalmus maximus</i> , España	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
ATCC43308	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Serotipo 0 O5												
ATCC43309	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Serotipo 0 O6												
ATCC43310	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Serotipo 0 O7												
ATCC43311	<i>Anguilla japonica</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Serotipo 0 O8												
ATCC43312	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Serotipo 0 O9												
ATCC43313	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Serotipo 0 O10												
ATCC43314	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

5.2 El gen *fvtA* es funcional en los serotipos O1, O2 y O3 de *V. anguillarum*

Hemos visto que todas las cepas de *V. anguillarum* contienen los genes *vab*, produzcan o no el sideróforo vancrobactina, y que la ausencia de producción de este sideróforo en algunas cepas se debe a la inserción de una transposasa en el gen *vabF*. Además, todas las cepas contienen el gen del receptor de vancrobactina *fvtA*. La pregunta que nos planteamos es si el gen *fvtA* se expresa en las cepas que no producen vancrobactina. Para buscar una respuesta a este interrogante, se procedió a detectar la posible existencia de transcritos del gen *fvtA* mediante RT-PCR, en una colección de cepas pertenecientes a los serotipos O1, O2 y O3 (los más importantes en cuanto a patogenicidad).

El RNA obtenido a partir de cultivos en condiciones de déficit de hierro se utilizó para realizar experimentos que permitiesen detectar la presencia del RNAm de *fvtA*. El resultado de las RT-PCR (Figura IV.24) muestra que, en todas cepas de *V. anguillarum* probadas, la amplificación del fragmento interno del gen *fvtA* es positiva. Además, al secuenciar los fragmentos amplificados se comprobó que en todos los casos el producto de la amplificación se correspondía con la región interna del *fvtA* esperada y las secuencias fueron 100% idénticas a la del gen *fvtA* de la cepa RV22.

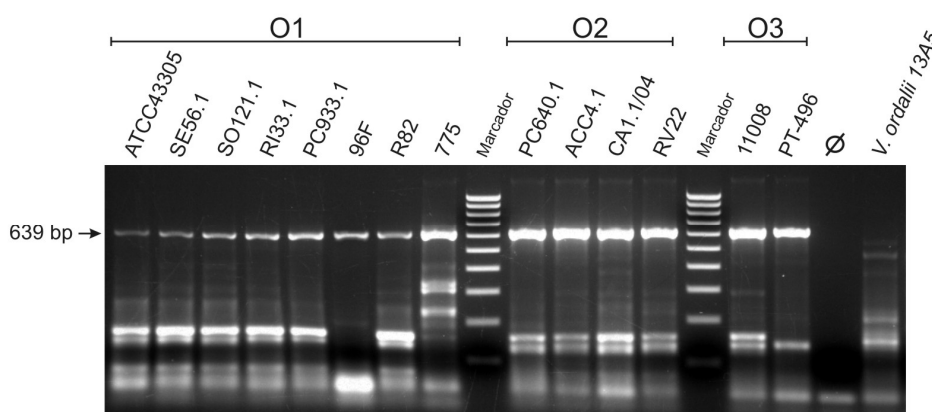


Figura IV. 24: Resultado del experimento de RT-PCR realizado para detectar la expresión del gen del receptor de vancrobactina (*fvtA*) en una colección de cepas de *V. anguillarum* crecidas en condiciones de déficit de hierro. El producto de amplificación esperado, de 639 pb, se marca con una flecha. Las cepas se agrupan por serotipos (O1, O2 y O3). (Ø) Control negativo, éste se corresponde con el control realizado con la extracción de RNA de la cepa RV22 tratada con DNasa. *V. ordalii* es la especie más cercana a *V. anguillarum*, y la cepa 13A5 se utilizó para asegurar que no se producía una amplificación inespecífica. Las bandas del marcador se corresponden con tamaños de 100 a 1000 pb.

Los resultados obtenidos con la RT-PCR confirman la observación de que la cepa 775 de *V. anguillarum* es capaz de transportar eficientemente vancrobactina (Soengas *et al.*, 2008). Además, la región que codifica *fvtA-vabD* en 775 es idéntica a la de RV22 y en aquella *vabD* es un gen funcional (Naka *et al.*, 2008). Estos datos ya sugerían que el gen *fvtA*, cuyo promotor dirige la transcripción de *vabD*, se está expresando tanto en las cepas productoras de vancrobactina como en las que producen anguibactina, lo cual se ha visto corroborado por los resultados de la RT-PCR.

5.3 Presencia de pseudogenes *fat* en la cepa RV22

Durante la realización de este trabajo se publicó la presencia de secuencias con gran similitud a los genes *fatA* y *fatD*, presentes en el plásmido pJM1, en cepas no portadoras de plásmidos (Bay *et al.*, 2006). Estos genes codifican el receptor y el transportador de tipo ABC necesarios para la internalización de anguibactina (Stork *et al.*, 2002). Para comprobar la posible presencia de estos genes en la cepa RV22 productora de vancrobactina se rastreó la presencia de estos genes en una genoteca de esta cepa y se pudo localizar un cósmido que contenía ambos genes. Al secuenciar esta región, se pudo comprobar la presencia de una copia de los genes *fatDCBA* en el cromosoma de la cepa RV22 junto a otros elementos presentes también en el pJM1. Como se describe en la Figura IV.25, estos genes presentan una disposición diferente en el cromosoma de RV22 y en pJM1. Además, es interesante destacar que la expresión de estos genes *fatDCBA* en el cromosoma de RV22 está truncada debido a la presencia de secuencias de inserción con un tamaño total cercano a 9 kb, que interrumpen el gen *fatD*, cuyo promotor controla la expresión del operón *fat*. Este hallazgo apoya los resultados negativos obtenidos al intentar detectar transcritos de estos genes mediante RT-PCR, y explica por qué la cepa RV22 es incapaz de utilizar la anguibactina como fuente de hierro ya que *fatA* no es un gen funcional. Además, Naka *et. al* (2008) detectaron la presencia de la proteína FatA en la membrana externa de RV22 únicamente cuando a esta cepa se le introducía el plásmido pJM1 mediante electroporación. Estos resultados generan interesantes preguntas sobre el origen y evolución de ambos sistemas en *V. anguillarum*, que se comentan en el apartado siguiente.

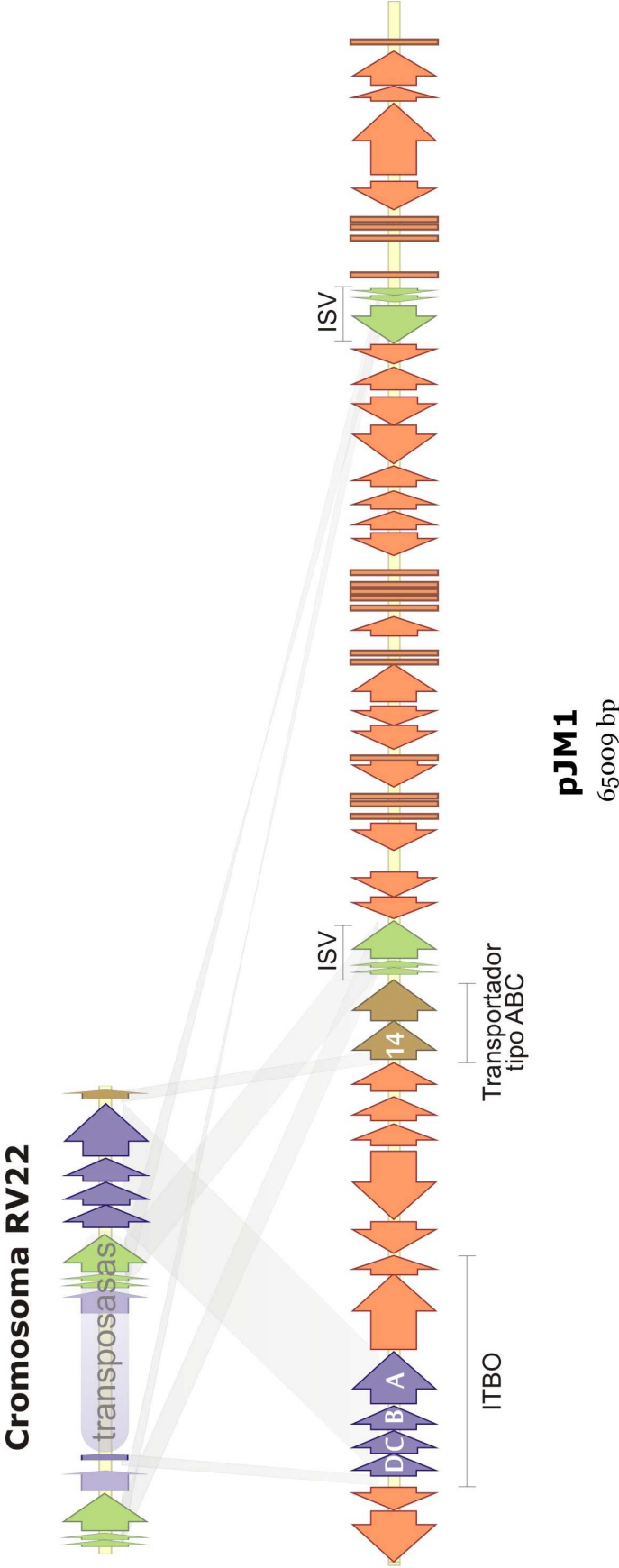


Figura IV.25: Esquema del operón IBTO presente en el cromosoma de la cepa RV22 en comparación con el plásmido pJM1. En el cromosoma, la pauta de lectura del gen *fatD* (D) está interrumpida por un grupo de transposasas presentes también en el pJM1. El *orf14* (14) del plásmido pJM1 es parte de un posible transportador de tipo ABC, el cual está también en el cromosoma de la cepa RV22 pero en diferente disposición. (ITBO) Operon de transporte y biosíntesis de anguibactina. (ISV) Secuencias de inserción presentes en copia múltiple.

5.4 Relaciones evolutivas entre los sistemas de la anguibactina y de la vancrobactina

Nuestros resultados evidencian una asociación inequívoca entre la presencia del plásmido pJM1 y la inserción de una transposasa (RS1) en el gen *vabF* que inactiva la producción de vancrobactina, pero que no inactiva su transporte. RS1 podría haberse insertado en *vabF* por transposición desde el plásmido pJM1 al cromosoma. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que RS1 codifica una proteína 100% idéntica a la RS1 (*orf21*) originalmente descrita en pJM1 (Di Lorenzo *et al.*, 2003). Según esta hipótesis, el sistema de la vancrobactina sería el sistema ancestral que se inactiva, en ciertas cepas del serotipo O1, tras la adquisición del plásmido pJM1. De todas formas, no se puede descartar otra hipótesis, que sería la de que la transposasa RS1 ya existiese en alguna localización cromosómica previamente a la adquisición de pJM1, y que de ahí se hubiese transpuesto tanto a *vabF* como al plásmido.

Si los sistemas de captación de hierro son tan importantes para el crecimiento de la célula, independientemente de su biotopo, ¿por qué no supuso un hándicap la inactivación del sistema de la vancrobactina?. Son varios los aspectos que podrían aportar luz para explicar esta cuestión: en primer lugar el plásmido pJM1 porta un sistema de sideróforos alternativo; cuando a la cepa 775 se le reactiva la síntesis de vancrobactina (mediante la eliminación de la RS1 que interrumpe *vabF*), la actividad de este sideróforo en el sobrenadante es residual, lo que sugiere que la adquisición de pJM1 provocó un descenso de la presión selectiva sobre este sistema dejando la puerta abierta a su inactivación por transposasas (Naka *et al.*, 2008). En segundo lugar, hay un aspecto que también podría contribuir a explicar por qué el sistema de la anguibactina sólo está presente en cepas del serotipo O1. En la cepa 775 los lipopolisacáridos de la superficie celular no sólo son un importante factor de patogenicidad crucial para la resistencia de la célula ante el efecto bactericida del suero, sino que se requieren para el crecimiento de esta cepa en condiciones de déficit de hierro, pues hay indicios de que el antígeno O1 estabiliza de algún modo el receptor de anguibactina (FatA) en la membrana externa (Welch & Crosa, 2005).

¿Cómo explicar entonces la presencia de los pseudogenes de transporte de anguibactina (*fatDCBA*) en el cromosoma de la cepa RV22?. Dicha presencia podría atribuirse

a eventos de transposición de ese grupo de genes desde el plásmido pJM1 al cromosoma. De hecho, los genes *fat* en pJM1 forman parte de un *cluster* génico con estructura de transposón compuesto, estando flanqueados estos genes por dos copias de un mismo elemento de inserción (ISV-A1 e ISV-A2, respectivamente). Este evento, además, sería un ejemplo de que pJM1 constituye un vehículo de entrada de nuevos genes de transposasas en el cromosoma de la cepa RV22.

El sistema de la vancrobactina ha sido propuesto como el sistema ancestral de captación de hierro en *V. anguillarum* en trabajos previos (Naka *et al.*, 2008), una hipótesis que se ve reforzada por el hecho de que todas las cepas en las que se ha probado la presencia del *cluster* de genes *vab* poseen estos genes y que la síntesis de anguibactina dependa en parte de genes que forman parte del cluster de la vancrobactina (Alice *et al.*, 2005; Naka *et al.*, 2008).

6. Regulación génica

6.1 Organización transcripcional

Tras analizar la estructura y orientación de los genes *vab* (Figura IV.26a), se postulan las regiones intergénicas *vabR-vabG*, *vabA-vabC* y *vabH-fvtA* como los promotores que controlan la expresión del *cluster*. De producirse la transcripción a partir de estas regiones los genes se organizarían en operones, por ejemplo, los genes *vabH*, *vabF*, *vabS* y *vabB* constituirían un transcrito de más de 12 kb. Además, aguas abajo de *vabR*, *vabG*, *vabA*, *vabE* y *vabB* se han localizado posibles terminadores transcripcionales independientes de Rho, lo que refuerza la idea de que la transcripción se produce en operones (Figura IV.26a).

Por todo lo expuesto, nos planteamos como hipótesis de trabajo que los genes del sistema de la vancrobactina se organizarían en seis unidades transcripcionales: *vabR*, *vabG*, *vabA*, *vabCE*, *vabHFSB* y *fvtAvabD*. Para comprobar la expresión de los genes *vab* y la asociación de los tres RNAm policistrónicos se realizaron retrotranscripciones utilizando cebadores complementarios a la región 3' terminal del último gen del operón (cebadores RT-0 al RT-6 en Figura IV.26b). Tras la retrotranscripción se amplificaron por PCR fragmentos internos de cada uno de los genes detectándose así la posible presencia del cDNA. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de tres RNAm policistrónicos, el primero comprende los genes *vabH*, *mbtH*, *vabF*, *vabS* y *vabB*, el segundo *vabC* y *vabE*, y el último está formado por los genes *fvtA* y *vabD* (Figura IV.26). Sin embargo, estos resultados no descartan la existencia de regiones promotoras adicionales que, de algún modo, permitan la transcripción independiente de alguno de estos genes. El experimento de RT-PCR se realizó en condiciones de déficit y suficiencia de hierro mostrando que la expresión de los genes *vab* se ve drásticamente reducida en condiciones de disponibilidad de hierro (Figura IV.26b). Estos resultados sugieren que la expresión de los genes *vab* se regula por la concentración de hierro. En los apartados siguientes se describe un estudio más exhaustivo de esta regulación.

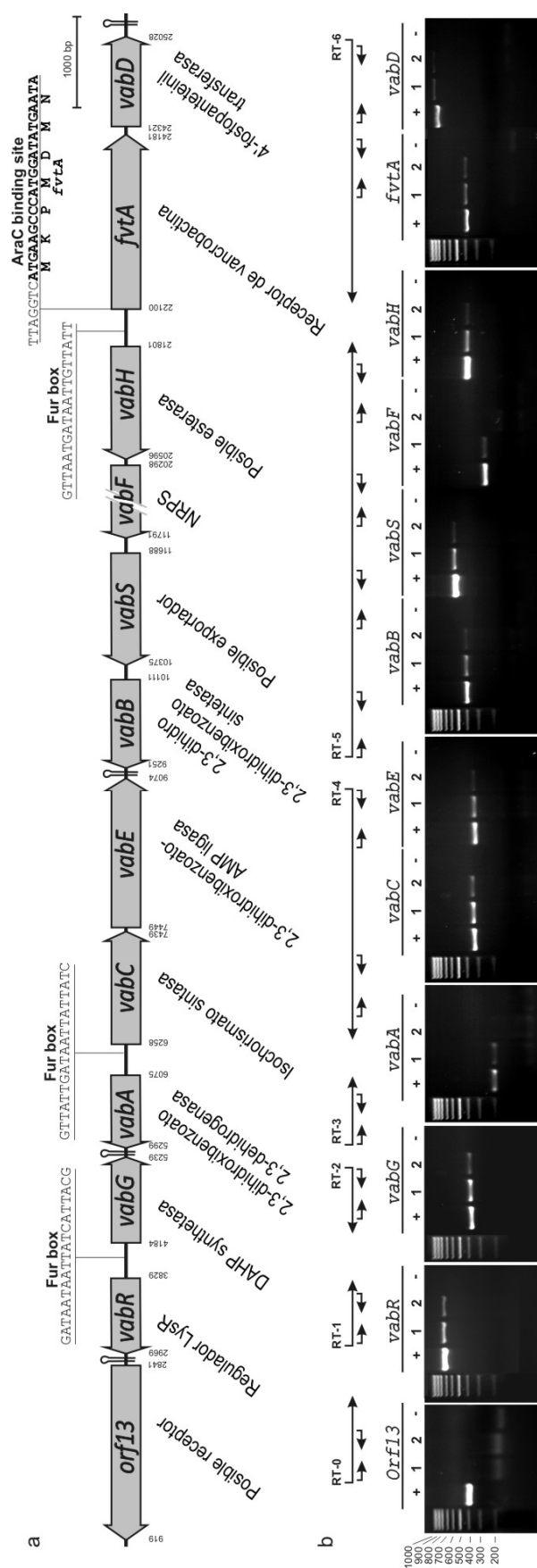


Figura IV.26: (a) Mapa del *cluster* de genes de la vancomicina. Los *orfs* se representan por flechas. Se marcan con números la posición de inicio y fin de cada gen y las secuencias diana de elementos de regulación. (b) Experimento de RT-PCR. Se representan la zona de unión-amplificación de los cebadores utilizados. La retrotranscripción se realizó a partir de cultivos en suficiencia y restricción de hierro, los cebadores utilizados en la retrotranscripción se nombran del RT-0 al RT-6. (+) representa el control positivo, condiciones de (1) déficit y (2) suficiencia de hierro y (-) el control negativo.

6.2 Presencia de cajas Fur en las regiones promotoras

Al examinar las regiones promotoras acotadas gracias a la RT-PCR, se reveló la presencia de tres posibles cajas Fur (Figura IV.26a). La región intergénica *vabR-vabG* contiene una posible caja Fur (GATAATAATTATCATTACG) con 15 de 19 posiciones idénticas a la secuencia consenso del Fur de *E. coli* (de Lorenzo *et al.*, 1987) (Las posiciones idénticas a la secuencia consenso de la caja Fur están subrayadas). Dos secuencias similares, GTTAATGATAATTGTTATT y GTTATTGATAATTATTATC, se localizaron en las regiones promotoras localizadas entre *vabH-fvtA* y *vabA-vabC* (Figura IV.26a). La posible presencia de cajas Fur en las zonas promotoras sugiere que la expresión de los genes *vab* está reprimida por la proteína Fur como respuesta a la concentración de hierro (ver introducción).

Para detectar si estas cajas Fur eran funcionales, se llevó a cabo un ensayo de titulación de Fur (*Fur titration assay* o FURTA) (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Los clones que portaban las regiones intergénicas de *vabR-vabG*, *vabH-fvtA* y *vabA-vabC* mostraron un claro fenotipo FURTA positivo (colonias Lac+ en placas de MacConkey suplementadas con exceso de hierro)(Figura IV.27), lo que sugiere que los fragmentos clonados contienen secuencias capaces de unir eficientemente el Fur de *E. coli*. Este resultado es en cierta forma redundante, pues estas regiones se detectaron en diferentes clones FURTA positivos analizados en el inicio del trabajo. Sin embargo, en esta ocasión los fragmentos cortados contenían las regiones promotoras exclusivamente, mientras que en el FURTA inicial eran fragmentos aleatorios que en muchos casos contenían fragmentos de varias kb de tamaño.

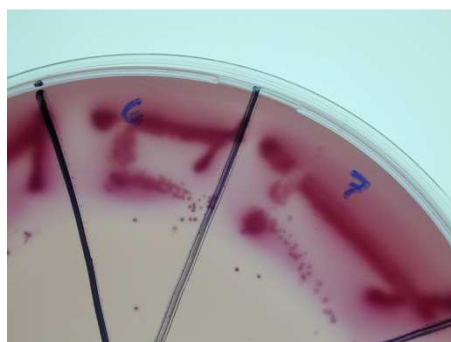


Figura IV.27: Colonias con fenotipo FURTA positivo (Lac+) en placa de McConkey.

Además de la represión ejercida por Fur, en los complejos mecanismos de regulación intervienen otros procesos de regulación génica (Chen & Croso, 1996; Gallegos *et al.*, 1997). Utilizando el software de análisis de promotores “Virtual Footprint” de la base de datos PRODORIC, se pudo predecir un posible motivo de unión a reguladores de tipo AraC en la hebra negativa del promotor de *fvtA* (TATTCATATCCATGGGCTTCATGACCTAA). Esta posible caja AraC incluye el codón de inicio de la transcripción de *fvtA* (Figura IV.26a).

6.3 Los genes *vab* se expresan únicamente en condiciones de déficit de hierro: la represión por Fur

Para determinar la actividad de las regiones promotoras acotadas por RT-PCR y estudiar sus niveles de expresión y regulación, se construyeron seis fusiones transcripcionales: *vabR::lacZ*, *vabG::lacZ*, *vabH::lacZ*, *fvtA::lacZ*, *vabC::lacZ* y *vabA::lacZ*. Para ello se amplificaron por PCR las tres regiones promotoras y se clonaron en el plásmido pHRP309, teniendo en cuenta las orientaciones de los fragmentos clonados. Se analizaron los niveles de expresión de cada uno de los promotores bajo condiciones de limitación y disponibilidad de hierro, tanto en la cepa silvestre (RV22) como en la cepa 775met11 deficiente en la síntesis de Fur (Tolmasky *et al.*, 1994). Como control negativo se analizaron los niveles de expresión del plásmido pHRP309 sin contener fragmento alguno clonado. Estos controles mostraron niveles de expresión indetectables.

En la cepa salvaje RV22 y en condiciones de déficit de hierro, todas las fusiones probadas mostraron altos niveles de actividad de la β -galactosidasa (Figura IV.28). Por el contrario, cuando se ensayaron en condiciones de disponibilidad de hierro, los valores de actividad β -galactosidasa alcanzados se redujeron más de un 90%, con la única excepción de la fusión *vabG::lacZ*, que mantuvo el 50% de la actividad alcanzada previamente (Figura IV.28). Estos resultados implican que las regiones acotadas por RT-PCR son promotores divergentes funcionales y que, excepto el de *vabR*, estos promotores se expresan específicamente bajo condiciones restrictivas de hierro (Figura IV.28).

Para determinar si el descenso en los niveles de expresión estaba mediado por la proteína Fur, se probaron las mismas construcciones en la cepa *fur*⁻ 775met11 (Tolmasky *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura IV.28. En la cepa *fur*⁻ las

fusiones de los promotores *vabH*, *fvfA*, *vabC* y *vabA* presentaron una expresión constitutiva. Si comparamos los niveles de expresión máximos alcanzados en la cepa RV22 y en la cepa 775met11 observamos que dichos valores son equivalentes. Esto indica que el empleo de una cepa no isogénica no ha provocado un sesgo en las medidas de la actividad de los promotores y que la proteína Fur es el factor que reprime la actividad de los promotores *vabA*, *vabC*, *vabH* y *fvfA*.

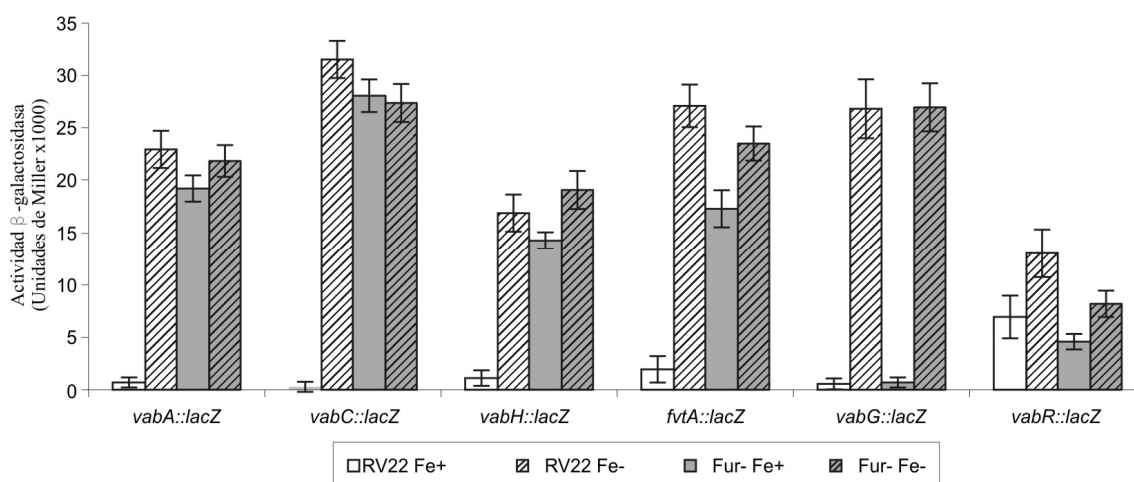


Figura IV.28: Actividad de los promotores que controlan la expresión de los genes *vab*, medida mediante fusiones transcripcionales con el gen *lacZ*. Las barras representan las unidades de β -galactosidasa alcanzadas en las diferentes condiciones. Se utilizaron dos condiciones de hierro: suficiencia (Fe+) (CM9 con 10 μ M de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) y restricción (Fe-) (CM9 con 5 μ M de EDDA). El experimento se realizó en la cepa RV22 y en la cepa 775 defectiva para el gen *fur* (775met11).

Las fusiones *vabG::lacZ* y *vabR::lacZ* muestran una respuesta en la cepa *fur*⁻ diferente a las anteriores. En la cepa *fur*⁻ el promotor de *vabG* mantiene una reducción drástica de sus niveles de expresión como respuesta al aumento de la disponibilidad de hierro. Este resultado revela la necesaria existencia de otro regulador que, en respuesta a la concentración intracelular de hierro, controla la expresión de *vabG*. Que la expresión de *vabG* esté tan estrictamente regulada por hierro, aunque de forma independiente de Fur, está en consonancia con la función que desempeña este gen en el sistema de captación de hierro. Como hemos visto, VabG actúa como una DHAP sintasa específica que proporciona el corismato necesario para la síntesis de sideróforo (ver apartado 2.5).

Con la fusión *vabR::lacZ* también se obtuvo un resultado inesperado. En condiciones de disponibilidad de hierro se aprecia un descenso en los niveles de expresión del $55\% \pm 12\%$ en la cepa RV22 y del $64\% \pm 14\%$ en la cepa 775met11 (*fur*⁻) (Figura IV.28). Estos resultados sugieren que esta fusión no varía su patrón de expresión en ausencia de la proteína Fur. Sin embargo, y en el caso concreto de esta construcción, se produce un claro efecto derivado de la utilización de una cepa *fur*⁻ no isogénica, pues los niveles de expresión máximos calculados en ambas condiciones descienden un 40% en la cepa 775met11 al compararlos con la RV22 (Figura IV.28). Esta disminución podría atribuirse a que la 775met11 es una cepa no productora de vancrobactina. Con todo ello, parece claro que el patrón mostrado en la cepa RV22 se mantiene en la cepa 775met11, ya que en ambas el descenso de la expresión motivado por la disponibilidad de hierro en el medio es equivalente. Aunque la reducción de actividad no es tan intensa como la descrita en el resto de los promotores, el descenso es claramente hierro-dependiente y no parece estar relacionado con la presencia de la proteína Fur.

Los resultados obtenidos con las fusiones *vabG::lacZ* y *vabR::lacZ* sugieren la necesaria intervención de un mecanismo de regulación alternativo a la proteína Fur que modula la expresión de los genes *vabG* y *vabR*. Asimismo, de los resultados se puede concluir que: (1) la regulación de los genes *vabG* y *vabR* es dependiente de la concentración de hierro; (2) la región intergénica *vabG-vabR* muestra un fenotipo FURTA positivo en la cepa indicadora H1717, por lo que debe contener cajas Fur. Estos resultados no descartan la intervención indirecta de la proteína Fur junto a otro regulador todavía sin caracterizar, y que en ausencia de Fur ese segundo represor siga actuando, mostrando niveles parecidos de expresión. La comprensión de los factores de regulación que modulan la expresión de estos genes está supeditada al diseño y realización de futuros estudios específicos.

Se han descrito casos en los que Fur ejerce efectos directos o indirectos sobre moduladores de expresión que actúan a su vez sobre genes regulados por hierro. Por ejemplo, los estudios de regulación realizados en el sistema de la anguibactina han demostrado que, además de la regulación general ejercida por Fur (Tolmasky & Crosa, 1991), actúan otros factores codificados en el propio plásmido como la proteína AngR (Tolmasky et

al., 1993; Wertheimer *et al.*, 1999), el factor TAF (*trans-acting factor(s)*) (Welch *et al.*, 2000), y los RNAs antisentido RNA α /RNA β (Chen & Crosa, 1996; Stork *et al.*, 2007a).

Al evaluar los niveles de expresión de cada una de las construcciones demostramos que todos los genes del *cluster* de vancrobactina están regulados por la concentración de hierro. La represión de los genes *vab* en respuesta a la concentración de hierro ya se sugería con los resultados obtenidos en las RT-PCR; sin embargo, no existe una total correlación entre ambos experimentos. En las fusiones transcripcionales la expresión del promotor de *vabG* es la que muestra mayor nivel de represión, mientras que en el gel de las RT-PCR se aprecia una clara amplificación en estas mismas condiciones (Figura IV.26b). Los resultados realmente cuantitativos son los obtenidos mediante fusiones, ya que aunque se ajustaron las cantidades iniciales de RNA, el objetivo de las RT-PCR no era la obtención de datos cuantitativos.

6.4 Efecto de VabR sobre la expresión de *vabG*

El gen *vabR* codifica un probable factor transcripcional perteneciente a la familia de los LTRs y cuya delección no parece afectar a la capacidad de crecimiento de RV22 en déficit de hierro ni a los niveles de producción de vancrobactina (apartado 4.3). La mayoría de los miembros de la familia de LTRs se transcriben a partir de promotores divergentes situados junto a sus genes diana, cuya transcripción se activa cuando el regulador se une a una molécula determinada (coinductor) (Schell, 1993; Gallegos *et al.*, 1997). La disposición de *vabR* y *vabG* encaja con el modo de acción de esta familia de activadores, por lo que *vabR* podría ejercer un efecto regulador sobre la expresión de *vabG*. Como hemos visto anteriormente, *vabG* codifica una DAHP sintasa esencial para la síntesis de la vancrobactina, al proporcionar el exceso de corismato necesario para su síntesis. Sabemos también, que su expresión es dependiente de la concentración de hierro aunque es independiente de la proteína Fur.

Para comprobar el efecto de *vabR* sobre la transcripción de *vabG*, se introdujo la fusión *vabG::lacZ* en la cepa mutante MB53 ($\Delta vabR$) y se compararon los niveles de expresión en esta cepa con respecto a los obtenidos en la cepa salvaje RV22 (Figura IV.29). Como se esperaba, esta fusión mantiene una fuerte represión en condiciones de disponibilidad de

hierro, observándose niveles equivalentes en las dos cepas analizadas. En condiciones de déficit de hierro, el mutante *vabR* mostró niveles de β -galactosidasa significativamente menores a los obtenidos en la cepa salvaje. Este descenso se ha estimado entre el 35% y el 40% (Figura IV.29). Estos resultados claramente sugieren que *vabR* codifica un factor necesario para alcanzar los niveles máximos de expresión de *vabG*. Se han descrito otros ejemplos de reguladores de la familia de las LTTRs que actúan de forma cooperativa con Fur en la regulación de rutas de aminoácidos (Panina *et al.*, 2001), factores de virulencia (Watnick *et al.*, 1998) y mecanismos de captación de hierro (Vasil *et al.*, 1998; Litwin & Quackenbush, 2001).

Una vez demostrado el efecto regulador que ejerce VabR sobre la expresión de *vabG*, se comprobó si VabR ejercía algún otro tipo de efecto regulador sobre otros genes del sistema o sobre su propio gen, introduciendo el resto de fusiones (*vabR::lacZ*, *vabH::lacZ*, *fvtA::lacZ*, *vabC::lacZ* y *vabA::lacZ*) en la cepa MB53 ($\Delta vabR$). Los resultados obtenidos sugieren que VabR no ejerce efecto alguno sobre la expresión de los promotores de *vabH*, *fvtA*, *vabC* y *vabA*, ni sobre el suyo propio.

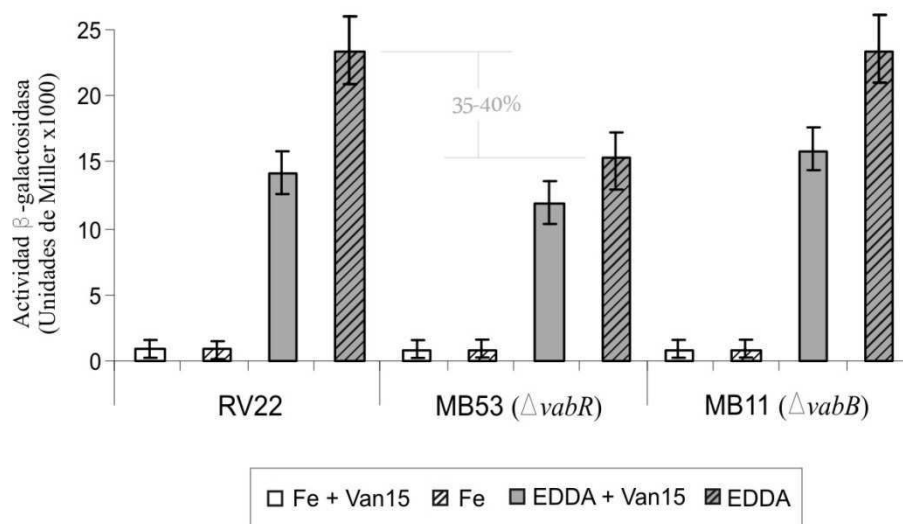


Figura IV.29: Cuantificación de la expresión del gen *vabG* utilizando una fusión *vabG::lacZ*. La expresión de este gen se estudió en suficiencia (Fe) y déficit de hierro (EDDA), tanto en la cepa RV22 como en el mutante MB53 ($\Delta vabR$) y MB11 ($\Delta vabB$).

En cuanto al modo de acción de VabR, nos planteamos probar la posibilidad de que la vancrobactina actuase como coinductor. Con este propósito se compararon los niveles de expresión de *vabG* en presencia y en ausencia de vancrobactina. Para ello se introdujo la

fusión *vabG::lacZ* en la cepa MB11 ($\Delta vabB$), que no produce vancrobactina, y se comparó con la cepa parental RV22 y con MB53 ($\Delta vabR$). Como se ve en la Figura IV.29, en condiciones de disponibilidad de hierro las tres cepas se comportaron de igual modo. En condiciones de déficit de hierro (1.25 μM de EDDA, condiciones para permitir el crecimiento de los mutantes) no hubo diferencias significativas entre el mutante no productor de vancrobactina (MB11) y la cepa parental, pero si entre ésta y MB53, como se indicó anteriormente. Cuando se añadió vancrobactina a una concentración final de 15 ng ml^{-1} , se produjo un descenso, estimado entre el 33% y 36%, en la actividad del promotor de *vabG* en cada una de las cepas utilizadas. Se puede atribuir este efecto a que la vancrobactina exógena produce una relajación de las condiciones de déficit de hierro, lo que conllevaría una mayor represión de *vabG* y seguramente del resto de genes del sistema mediante Fur. Los resultados obtenidos descartan a la vancrobactina como ligando necesario para que VabR active la expresión de *vabG*.

Todos estos datos evidencian el efecto activador ejercido por VabR sobre la expresión de *vabG* (Figura IV.30), y sobre los genes que intervienen en la biosíntesis de vancrobactina. Los genes relacionados con el transporte y utilización parecen no necesitar la presencia de este regulador transcripcional para alcanzar sus niveles de expresión máximos.

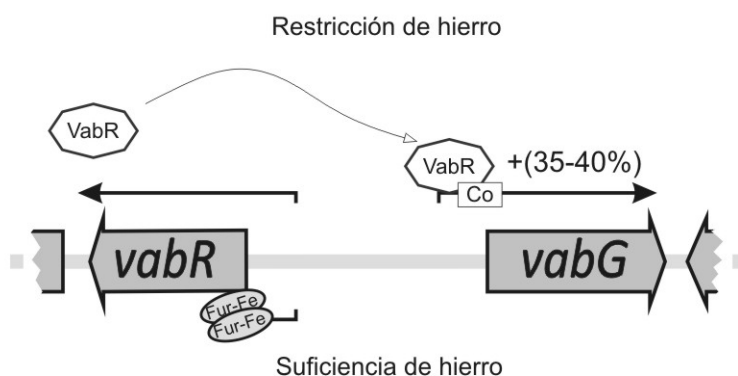


Figura IV.30: Modelo de acción propuesto para VabR. Co representa el coinductor necesario para que los reguladores de la familia LysR ejerzan su efecto sobre el gen diana.

6.5 Efecto de la vancrobactina sobre la expresión de *fvtA*

La región promotora del gen *fvtA* contiene una posible diana de reguladores transcripcionales de la familia AraC (caja AraC). En otros trabajos se ha evidenciado que los microorganismos son capaces de detectar la presencia de sideróforos en el medio extracelular, mediante un proceso que conduce a la sobreexpresión de los genes necesarios para su internalización. Uno de estos mecanismos se basa en la activación que ejercen reguladores transcripcionales de tipo AraC, que requieren la presencia de hierro-sideróforo para unirse a regiones específicas situadas en los promotores sobre los que ejercen su acción (Fetherston *et al.*, 1996; Pelludat *et al.*, 1998; Brickman *et al.*, 2001; Anderson & Armstrong, 2004). Para comprobar la posible existencia de un regulador transcripcional que, como respuesta a la presencia de hierro-vancrobactina, module la expresión del receptor, se introdujo la fusión *fvtA::lacZ* dentro de la cepa no productora de vancrobactina MB11 ($\Delta vabB$). A continuación se midieron las unidades de β -galactosidasa producidas en esta cepa, utilizando condiciones menos restrictivas de hierro (1.25 μ M de EDDA) para permitir al mutante MB11 alcanzar un crecimiento normal y poder comparar así los resultados obtenidos con la cepa parental RV22. En estas condiciones no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas. En condiciones de disponibilidad de hierro, la cepa parental mostró valores que representaban el $7.3\% \pm 2.1\%$ de la expresión máxima calculada en déficit de hierro. Sin embargo las unidades calculadas de β -galactosidasa de la fusión *fvtA::lacZ* dentro de la cepa no productora de vancrobactina (MB11) fue del $1.18\% \pm 0.74\%$ (Figura IV.29). Estos resultados sugieren que el promotor de *fvtA* se sub-expresa en ausencia de vancrobactina (seis veces menos activo) y, por tanto, la hierro-vancrobactina podría tener un papel importante en su regulación. Para comprobar este efecto, se añadió vancrobactina purificada a los cultivos anteriores (a concentraciones finales de 15 ng ml^{-1} y 30 ng ml^{-1}) y se midió una hora después la actividad del promotor *fvtA*. En la Figura IV.31 se observa cómo al añadir la vancrobactina aumenta la actividad (tres veces mayor) del promotor. Además, esta relación es lineal, cuando se dobló la cantidad de vancrobactina las unidades de β -galactosidasa se multiplicaron por dos. De igual modo se probó si la vancrobactina tenía efectos similares sobre la regulación del resto de promotores. El análisis de las fusiones

vabR::lacZ, *vabH::lacZ*, *vabG::lacZ*, *vabC::lacZ* y *vabA::lacZ* en la cepa MB11 ($\Delta vabB$), no mostró diferencia significativa alguna al compararlas con la cepa parental.

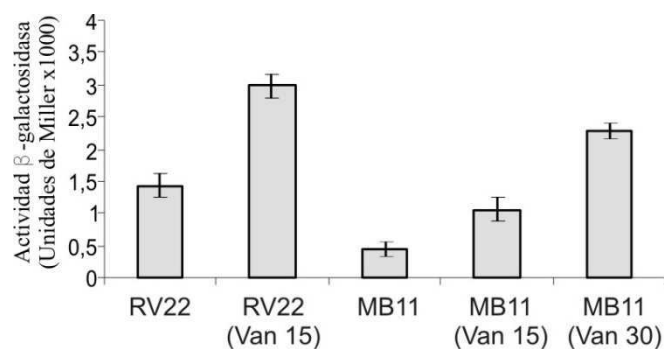


Figura IV.31: Expresión del receptor de vancrobactina (*fvtA*) en condiciones de suficiencia de hierro. Se muestran los valores alcanzados (barras) en la cepa RV22 y en el mutante de biosíntesis MB11. Se añadió al medio 15 ng ml⁻¹ (VAN 15) o 30 ng ml⁻¹ (VAN 30) de vancrobactina.

Los resultados obtenidos apoyan por tanto la existencia de un mecanismo sensible a hierro-vancrobactina que promueve la expresión de *fvtA* cuando el sideróforo está presente en el medio.

A partir de todos los datos descritos se propone el esquema de regulación que se muestra en la Figura IV.32.

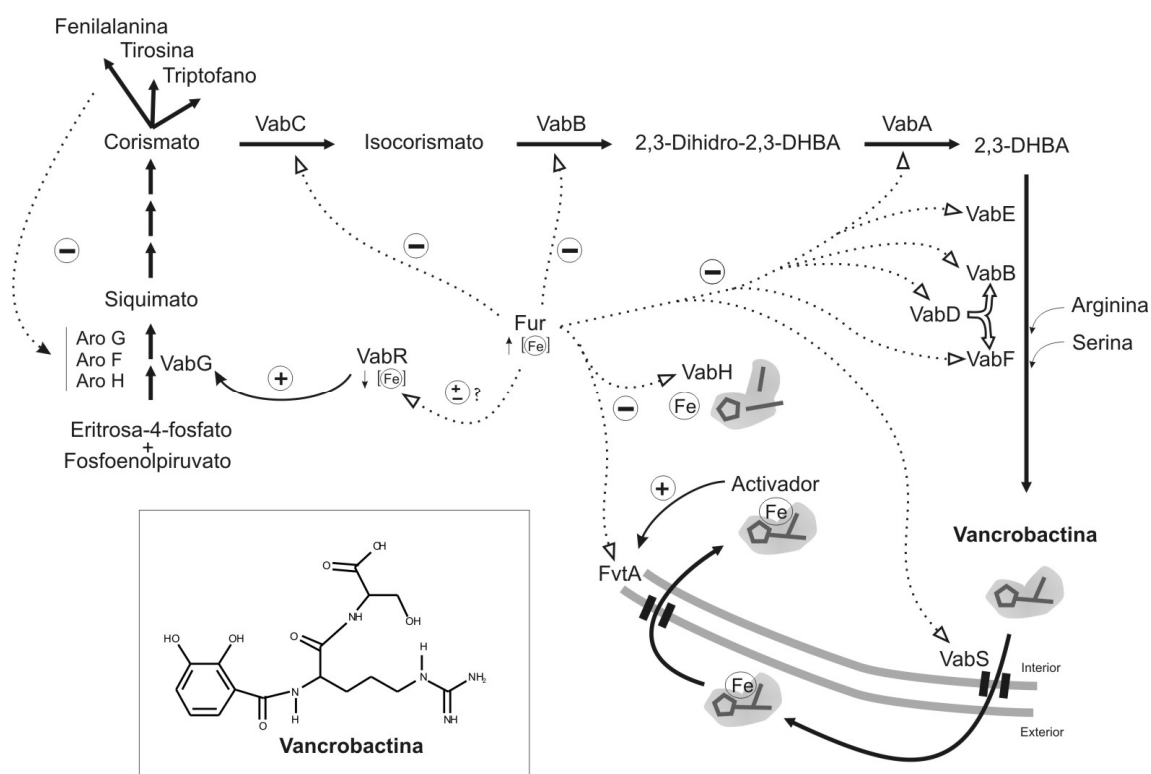


Figura IV.32: Esquema de biosíntesis y regulación del sistema de la vancrobactina. El nivel de expresión de los genes *vab* está directamente relacionado con la cantidad de hierro intracelular, de modo que sólo se expresan en condiciones de déficit de hierro. Fur es el regulador general de este sistema, ejerciendo su efecto represor sobre todos los genes, a excepción de *vabG* y *vabR*. Aunque la expresión de *vabG* está fuertemente regulada por hierro ésta es independiente de la proteína Fur y necesita a VabR para alcanzar sus niveles máximos de expresión. En la expresión del gen que codifica el receptor de vancrobactina (*fvtA*) actúa un activador sensible al complejo hierro-vancrobactina. Las flechas de líneas discontinuas y punta hueca representan procesos de represión. Las flechas de línea continua indican procesos de activación. La flecha discontinua con punta sólida representa retroalimentación negativa ejercida por producto final.

7. Aplicación del sistema de la vancrobactina para el diseño de nuevos antimicrobianos

A partir de los resultados obtenidos al estudiar el sistema de la vancrobactina, nos planteamos explorar la posibilidad de utilizar este sistema de captación de hierro para el desarrollo de nuevos antimicrobianos que ayuden a reducir la incidencia de la vibriosis en las plantas de cultivo. Como se ha expuesto en la introducción, la presencia de sistemas de transporte de hierro es determinante para que un microorganismo sea patógeno. La utilización de un sistema esencial directamente implicado en la patogenicidad como vía de entrada de un antimicrobiano dificultaría la aparición de cepas resistentes (Miller *et al.*, 2009).

7.1 Estudio de la actividad biológica de análogos de vancrobactina

Una vez establecida la estructura química y diseñado un método de síntesis de vancrobactina (Soengas *et al.*, 2007), se planteó la posibilidad de sintetizar análogos estructurales con el objetivo de valorar la utilización de esta ruta de adquisición de hierro para desarrollar antimicrobianos específicos. Se podrían utilizar dos estrategias distintas: intentar bloquear este sistema de captación de hierro, lo que provocaría un descenso en la patogenicidad, o utilizar análogos del sideróforo nativo como vectores de entrada de un compuesto antimicrobiano, para de esta manera aumentar su eficiencia y especificidad al ser transportado el conjunto de forma activa hasta el interior de la célula diana. Esta última estrategia es lo que se conoce como “Caballo de Troya” (Miller *et al.*, 2009).

En Soengas *et al.* (2008) se detalla el esquema de síntesis química seguido para la obtención de los diferentes análogos. Las estructuras de estos derivados se han diseñado de tal forma que se minimicen las interacciones entre grupos funcionales a la hora de conjugar estos compuestos con un fármaco. Aquellos análogos que tengan actividad quelante de hierro y sigan promoviendo el crecimiento de la cepa RV22 serán útiles para transportar sustancias con acción bactericida, por ejemplo un antibiótico.

La capacidad de unir hierro de los diferentes derivados se evaluó mediante la reacción de CAS (Tablas IV.12). La mayoría de los análogos alcanzaron valores de CAS comprendidos

entre -0.353 del compuesto RA243L (DHBA-L-Orn) y -0.788, valor obtenido por RA237D (DHBA-D-Ser), con la excepción de los compuestos RA214LL (DHBA-L-Ser-L-Orn) y RA214LD (DHBA-L-Ser-D-Orn) en los que, por causas que se desconocen, la reacción fue negativa. Sin embargo estos compuestos sí presentan cierta actividad biológica (Tablas IV.12). Hay que tener en cuenta que un alto valor de CAS no tiene por qué implicar necesariamente una mayor actividad biológica (Dong *et al.*, 2004), ya que estos compuestos deben atravesar la membrana celular. La reacción de CAS es reflejo de la avidez con que cada compuesto se une al hierro, mientras que la capacidad de promover el crecimiento de la cepa indicadora tiene que ver con su actividad quelante combinada con la eficiencia de la célula a la hora de transportar ese compuesto.

Nos interesaba determinar qué análogos promovían el crecimiento de las cepas indicadoras, lo que sería indicativo de que mantenían intacta su actividad como sideróforo y que eran captados eficientemente por la célula. En los bioensayos se utilizaron diferentes cepas indicadoras, seleccionadas por tener fenotipos bien establecidos, lo que nos permitió controlar qué utiliza cada una de ellas como fuente de hierro. Las cepas seleccionadas como indicadoras fueron las siguientes: RV22, *V. anguillarum* serotipo O2 productor de vancrobactina; 775 (contiene pJM1), *V. anguillarum* serotipo O1 productor de anguibactina (no produce vancrobactina); *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *enb*-1 defectiva en la producción de enterobactina, que puede utilizar vancrobactina como fuente de hierro; PPV20 de *Erwinia chrysanthemi*, mutante de biosíntesis de la chrysobactina, que es el sideróforo estructuralmente más cercano a la vancrobactina (Persmark *et al.*, 1992); como control negativo se utilizó la cepa TA15 de *V. alginolyticus* que no utiliza sideróforos de tipo catecol.

Bioensayos con cepas de *V. anguillarum*

Todos los análogos utilizados inducen de algún modo el crecimiento de las cepas de *V. anguillarum* ensayadas (Tablas IV.12). La única excepción la observamos con el compuesto DHBA-L-Orn (3a) RA243L, que no induce el crecimiento de ninguna de las dos cepas indicadoras. Durante la preparación de las muestras se observó que este análogo posee una baja solubilidad, aspecto que podría estar afectando al resultado.

Tanto el sideróforo natural como los análogos ensayados producen los mayores halos de crecimiento al utilizar la cepa RV22 (serotipo O2) como indicadora (Tabla IV.12). La estructura DHBA-Arg-Ser es la que presenta mayor actividad biológica. Los resultados mostraron que los compuestos que tienen ornitina en vez de arginina también promueven de forma significativa el crecimiento de *V. anguillarum*, dato que resulta de gran interés, ya que este derivado de la vancrobactina posee un grupo amino que podría utilizarse para unir covalentemente algún tipo de fármaco, por lo que este tipo de análogos es el más conveniente para su utilización como vector en la estrategia de “Caballo de Troya”.

En el caso de la cepa 775 (serotipo O1), los compuestos con el DHBA unido directamente a la serina y a la L-ornitina son los que mostraron mayor actividad biológica (Tabla IV.12). A pesar de que esta cepa presenta en el cromosoma una copia del gen *fvtA* funcional, la cepa RV22 y la 775 muestran respuestas diferentes, las cuales se pueden atribuir a patrones de expresión distintos entre ambos serotipos, ya evidenciados en perfiles de proteínas de membrana externa (Conchas *et al.*, 1991).

Bioensayos con *Erwinia chrysanthemi* PPV22

Esta cepa produce chrysobactina, un sideróforo de tipo catecol compuesto por DHBA-lisina-serina (Persmark *et al.*, 1989). Sin duda se trata del sideróforo más cercano a la vancrobactina (DHBA-arginina-serina) en cuanto a estructura, al sustituirse arginina por lisina. Por esta razón se decidió comprobar la actividad biológica de la vancrobactina y sus análogos sobre esta cepa. Los compuestos que más actividad mostraron a la hora de promover el crecimiento de esta cepa son los que presentan ornitina o arginina unidos al DHBA, mientras los compuestos con el DHBA unido a la serina mostraron poca o nula actividad (Tabla IV.12). Estos resultados indican que los receptores que median este transporte probablemente presenten una mayor especificidad estructural por su sustrato en *E. chrysanthemi* que en *V. anguillarum*.

Bioensayos con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *enb-1*

Todas las cepas de *Salmonella* producen enterobactina (trímero cíclico de 2,3-dihidroxi-N-benzoil-L-serina). En estudios previos se ha demostrado que esta cepa es capaz de utilizar la vancrobactina como fuente de hierro (Conchas *et al.*, 1991). Con el fin de comprobar la especificidad en la internalización del sideróforo, se procedió a valorar la entrada de los análogos de vancrobactina. Los resultados muestran que los compuestos que tienen ornitina en vez de arginina promueven mayores tasas de crecimiento (Tabla IV.12).

En este apartado se ha descrito cómo *V. anguillarum* puede solventar sus necesidades de hierro con un abanico relativamente amplio de sustancias derivadas de la estructura original de la vancrobactina. Sin embargo, queda por determinar si los análogos entran por un único receptor, y si éste es el mismo que utiliza el sideróforo natural. De todos los resultados obtenidos se concluye que los análogos con ornitina en vez de arginina (de estructura DHBA-Orn-Ser) parecen los más convenientes para su conjugación con un compuesto antimicrobiano por ser los de mayor actividad biológica y carecer de grupos reactivos que dificulten la unión sintética con el fármaco.

Tabla IV.12: Actividad biológica y valor obtenido en el test de CAS (A_{630}) de los análogos de vancrobactina. La actividad se representa como capacidad de promover el crecimiento de la cepa indicadora midiendo el diámetro del halo inducido, los valores son medias de tres experimentos independientes y se representan como: -, no crecimiento; +, halo <12 mm; ++, halo de 12-14 mm; +++, halo de 15-17 mm y ++++, halo de > 17 mm.

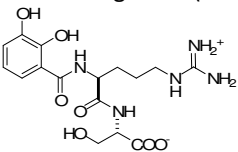
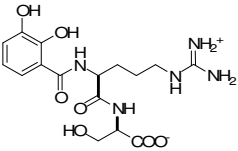
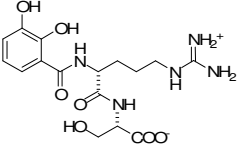
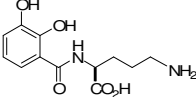
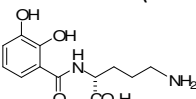
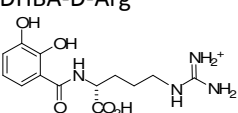
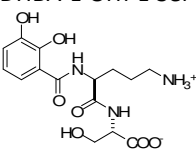
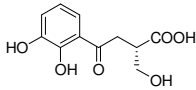
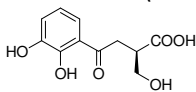
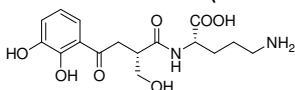
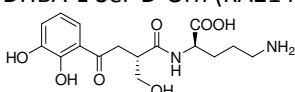
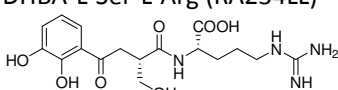
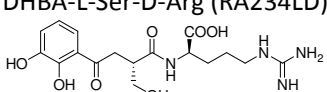
Compuesto de estructura DHBA-Orn(Arg)-Ser	Cepa indicadora					
	775	PPV20	TA15	RV22	<i>enb-1</i>	CAS
Control positivo ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$)	++++	++++	++++	+++	++	-
DHBA-L-Arg-L-Ser (RA241LL)						
	++	++	-	+++	-	-0.736
DHBA-L-Arg-D-Ser (RA241LD)						
	++	+	-	+++	-	-0.655
DHBA-D-Arg-L-Ser (RA241DL)						
	++	+++	-	++++	+	-0.714
DHBA-L-Orn (RA243L)						
	-	-	-	-	-	-0.353
DHBA-D-Orn (RA243D)						
	+++	+	-	++	++	-0.672
DHBA-D-Arg						
	++	++	-	++++	+	-0,476
DHBA-L-Orn-L-Ser (RA242LL)						
	+	+	-	++	++	-0.621

Tabla IV.12: Continuación

Compuesto de estructura DHBA-Ser-Orn(Arg)	Cepa indicadora					
	775	PPV20	TA15	RV22	<i>enb-1</i>	CAS
Control positivo ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$)	++++	++++	++++	+++	++	-
DHBA-L-Ser (RA237L) 	+++	-	-	++	-	-0.589
DHBA-D-Ser (RA237D) 	+++	-	-	++	-	-0.788
DHBA-L-Ser-L-Orn (RA214LL) 	+	+	-	++	+++	-
DHBA-L-Ser-D-Orn (RA214LD) 	+	+	-	++	+++	-
DHBA-L-Ser-L-Arg (RA234LL) 	+	-	-	++	-	-0.476
DHBA-L-Ser-D-Arg (RA234LD) 	+	+	-	++	+	-0.547

7.2 Determinación de la vía de entrada de los análogos

En el apartado anterior se describió que la vancrobactina y sus análogos inducen el crecimiento de *V. anguillarum*. Sin embargo, la ruta de entrada para estos análogos está por determinar. También ignoramos qué parte del sideróforo interviene en el reconocimiento receptor-ligando, información muy importante a la hora de modificar el sideróforo nativo sin que se pierda especificidad y, por tanto, eficiencia en su transporte. Las bacterias a menudo poseen múltiples receptores de membrana externa, que les permiten utilizar diferentes sideróforos. Este abanico de receptores pueden constituir vías de entrada alternativas para el transporte de los derivados del sideróforo nativo (Hantke, 1990; Rabsch *et al.*, 2003; Ferguson & Deisenhofer, 2004).

Nos propusimos por tanto determinar mediante bioensayos el papel que desempeñan FvtA y ORF13 en el transporte de los análogos de vancrobactina. Para ello, se utilizó la cepa MB11 ($\Delta vabB$) como cepa parental para obtener mutantes sencillos y dobles de *fvtA* y *orf13*. Al obtener las diferentes combinaciones de mutantes sobre una cepa no productora de vancrobactina (MB11 $\Delta vabB$), nos asegurábamos que los halos producidos en los bioensayos estaban directamente relacionados con la capacidad de transportar la sustancia ensayada y no con la producción endógena de vancrobactina. Los dobles mutantes MB102 ($\Delta vabB\Delta fvtA$) y MB104 ($\Delta vabB\Delta orf13$), así como el triple mutante MB107 ($\Delta vabB\Delta fvtA\Delta orf13$) fueron utilizados como cepas indicadoras, mientras que el mutante MB11 ($\Delta vabB$) se utilizó como control positivo. A pesar de que los resultados obtenidos anteriormente llevan a concluir que el gen *orf13* no se expresa, creímos conveniente incorporarlo a estos estudios, pues no podíamos descartar que su expresión se produjese ante la presencia de un inductor en el medio, por ejemplo, su ligando natural. Los compuestos probados y los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla IV.13.

Como esperábamos, la vancrobactina sintética y todos sus análogos fueron capaces de promover el crecimiento de MB11 ($\Delta vabB$) y MB104 ($\Delta vabB\Delta orf13$) (Tabla IV.13), pero no de las cepas MB102 ($\Delta vabB\Delta fvtA$) y MB107 ($\Delta vabB\Delta fvtA\Delta orf13$), incapaces de utilizar ninguno de los compuestos ensayados. Al complementar la cepa MB102 ($\Delta vabB\Delta fvtA$) con el plásmido pMB54 (portador de promotor y *fvtA* completos), la capacidad de transportar vancrobactina y sus análogos se recuperó completamente (Tabla IV.13). Estos resultados

demuestran que FvtA es el transportador de vancrobactina y de todos los derivados ensayados. Es importante destacar que todos los compuestos utilizados comparten el residuo de DHBA, lo que sugiere que la especificidad del receptor FvtA se basa en el reconocimiento del centro de unión hierro-catecol, mientras que el armazón D-Arg-L-Ser desempeña un papel secundario. Una situación similar se ha descrito en *Erwinia chrysanthemi*, en la que el grupo DHBA media el reconocimiento entre la chrysobactina y su receptor (Persmark *et al.*, 1992).

Tabla IV.13: Resultado de los bioensayos realizados con diferentes análogos de vancrobactina y sideróforos exógenos utilizando diferentes mutantes de transporte. La habilidad de cada compuesto para promover el crecimiento de las cepas ensayadas se indica de la siguiente manera: “+” positivo, “-” negativo y (+) positivo débil.

Compuesto	<i>V. anguillarum</i>				
	MB11 <i>ΔvabB</i>	MB102 <i>ΔvabBΔfvtA</i>	MB104 <i>ΔvabBΔorf13</i>	MB107 <i>ΔvabBΔfvtAΔorf13</i>	MB102 + pMB54
Vancrobactina	+	-	+	-	+
DHBA-Orn	+	-	+	-	+
DHBA-Orn-Ser	+	-	+	-	+
DHBA-Ser	+	-	+	-	+
DHBA-Ser-Arg	+	-	+	-	+
DHBA-Arg	+	-	+	-	+
Amonabactina	-	-	-	-	-
Anguibactina	-	-	-	-	-
Enterobactina	+	(+)	+	(+)	+
Ferricromo *	+	+	+	+	+
Aerobactina *	-	-	-	-	-

* Sideróforo de tipo hidroxamato

Es frecuente encontrar bacterias que utilizan sideróforos exógenos, capacidad que confiere una sustancial ventaja competitiva pues el hecho de piratear sideróforos sintetizados por bacterias del entorno implica un menor gasto energético a la vez que evita el efecto bacteriostático causado por la competencia por el hierro (Ratledge & Dover, 2000). *E. coli* K-12 posee al menos seis receptores de membrana externa que la hacen competente para utilizar ocho complejos hierro-quelante diferentes, de los que cuatro son exógenos (Andrews *et al.*, 2003).

Además de la vancrobactina y sus análogos, se probó la utilización de sideróforos exógenos (Tabla IV.13). Los resultados obtenidos demuestran que el ferricromo puede ser

utilizado tanto por la cepa parental como por las diferentes combinaciones de mutantes. Este resultado sugiere la existencia de un receptor adicional, diferente a FvtA y ORF13, responsable de la asimilación de ferricromo. De forma análoga, la enterobactina sigue promoviendo el crecimiento de los mutantes defectivos para *fvtA* y *orf13*. Esto implica la existencia de un receptor desconocido capaz de transportar un sideróforo de tipo catecol como la enterobactina. Esta cuestión es importante ya que la vancrobactina y la enterobactina guardan relaciones funcionales evidenciadas en trabajos previos (Lemos *et al.*, 1988; Conchas *et al.*, 1991) y explica por qué los mutantes $\Delta fvtA$ en CM9 con 5 μ M de EDDA mostraban todavía el 50% de la tasa de crecimiento de la cepa salvaje (apartado 3.1).

Por el contrario, la amonabactina, aerobactina y anguibactina no son utilizables por *V. anguillarum* RV22. Estos resultados respaldan trabajos previos en los que se evidencia la incapacidad de utilizar anguibactina por cepas que carecen de plásmidos del tipo pJM1, pues no expresan el receptor de membrana externa (FatA) responsable de su transporte al interior celular (Lemos *et al.*, 1988; Conchas *et al.*, 1991).

Puesto que nuestro objetivo es utilizar la maquinaria de transporte de vancrobactina como vía de entrada para transportar hasta el citoplasma a un agente antimicrobiano, para que esta estrategia sea eficiente en el control de la enfermedad, es importante que el sistema tenga una amplia distribución en *V. anguillarum*, pues de no ser así, la nueva terapia no sería funcional en buena parte de los casos. Anteriormente ha quedado suficientemente demostrada la presencia de los genes del sistema de la vancrobactina en el acervo genético de *V. anguillarum* (apartado 5.1). Además, utilizando una colección de cepas que representan los tres serotipos relacionados con los brotes de vibriosis (serotipo 01, 02 y 03), hemos demostrado que el gen del receptor de vancrobactina (*fvtA*) se expresa tanto en cepas productoras de vancrobactina como en las que producen anguibactina (apartado 5.2) y que la expresión de dicho receptor (FvtA) se induce en presencia de su ligando natural sin necesidad de que la célula se encuentre en condiciones de déficit de hierro (apartado 6.5). Este es un efecto que, de producirse ante la presencia del conjugado vancrobactina-fármaco, sería muy beneficioso para aumentar en lo posible la eficiencia de esta estrategia.

Por todo lo expuesto consideramos que la elección del sistema de la vancrobactina para desarrollar antimicrobianos utilizando la estrategia de “Caballo de Troya” es la más conveniente por ser un sistema ubicuo y funcional en todas las cepas de *V. anguillarum*.

En un futuro próximo pretendemos desarrollar algunos de estos nuevos fármacos, en colaboración con el grupo de Química Orgánica del Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña, para explorar su eficiencia y posible aplicabilidad.

V. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan nuevos conocimientos acerca del mecanismo de asimilación de hierro mediante sideróforos empleado por las cepas patógenas de *Vibrio anguillarum* no portadoras de plásmidos y se plantea su posible utilidad como diana terapéutica.

Las conclusiones concretas de todo lo expuesto en esta memoria son:

- (1) La vancrobactina está compuesta por el ácido 2,3-dihidroxibenzoico, y los aminoácidos arginina y serina, correspondiendo su estructura química a la N-[N'-(2,3-dihidroxibenzoil)-D-arginil]-L-serina.
- (2) La vancrobactina se sintetiza mediante un mecanismo dependiente de péptido-sintetasas no ribosómicas. Los genes *vabABCDEFG* codifican las proteínas necesarias para sus síntesis, *vabS* codifica el exportador necesario para el proceso de secreción del sideróforo, *fvtA* codifica el receptor de membrana externa que reconoce y transporta la ferri-vancrobactina y *vabH* es la esterasa del ferri-sideróforo, indispensable para la utilización del hierro transportado mediante este sistema.
- (3) El sistema de la vancrobactina parece ser el mecanismo primitivo de asimilación de hierro de *V. anguillarum*, puesto que los genes *vab* están presentes en todas las cepas examinadas. Evolutivamente el sistema que utiliza el sideróforo anguibactina, codificado en el plásmido pJM1, habría sido adquirido posteriormente, dando lugar a la inactivación de la síntesis de vancrobactina en las cepas que poseen dicho plásmido, mediante la transposición de secuencias de inserción.
- (4) El cluster de genes *vab* se organiza en 6 unidades transcripcionales cuya expresión está fuertemente regulada por la concentración de hierro, siendo el regulador transcripcional Fur el principal factor de regulación, aunque también se encontraron evidencias de la existencia de otros posibles reguladores.
- (5) El gen *vabG* codifica la primera isoenzima DAHP sintetasa descrita dedicada a la producción de sideróforos. Su expresión, sin estar regulada por Fur, es inversamente proporcional a la concentración de hierro del medio, siendo el

regulador VabR un factor necesario para que alcance sus niveles máximos de expresión.

- (6) Tanto la vancrobactina como sus análogos entran en la célula a través del receptor de membrana externa FvtA. La presencia del complejo hierro-vancrobactina en el medio induce la expresión del gen *fvtA*, lo que sugiere la necesaria existencia de un mecanismo de activación específico todavía desconocido.
- (7) Los resultados obtenidos abren la posibilidad de explotar este sistema de transporte de hierro para el diseño de nuevos agentes antimicrobianos contra la vibriosis, basados en sideróforos conjugados con antibacterianos, que puedan utilizar la misma vía de entrada en la célula que el sideróforo nativo.

VI. Bibliografía

- Actis, L. A., Fish, W., Crosa, J. H., Kellerman, K., Ellenberger, S. R., Hauser, F. M. & Sanders-Loehr, J. (1986).** Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1). *J. Bacteriol.* **167**, 57-65.
- Actis, L. A., Tolmasky, M. E. & Crosa, J. H. (1999).** Fish diseases and disorders. Viral, bacterial and fungal infections, 3 Stevenson RM, Woo PT, edn. Wallingford, UK: CAB International Publishing; p. 523-57.
- Actis, L. A., Tolmasky, M. E., Crosa, L. M. & Crosa, J. H. (1995).** Characterization and regulation of the expression of FatB, an iron transport protein encoded by the pJM1 virulence plasmid. *Mol. Microbiol.* **17**, 197-204.
- Adilakshmi, T., Ayling, P. D. & Ratledge, C. (2000).** Mutational analysis of a role for salicylic acid in iron metabolism of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **182**, 264-271.
- Ahmad, R., Hjerde, E., Hansen, G. A., Haugen, P. & Willassen, N. P. (2008).** Prediction and experimental testing of ferric uptake regulator regulons in vibrios. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 22.
- Albrecht-Gary, A. M. & Crumbliss, A. L. (1998).** Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Met. Ions Biol. Syst.* **35**, 239-327.
- Alice, A. F., Lopez, C. S. & Crosa, J. H. (2005).** Plasmid- and chromosome-encoded redundant and specific functions are involved in biosynthesis of the siderophore anguibactin in *Vibrio anguillarum* 775: a case of chance and necessity? *J. Bacteriol.* **187**, 2209-2214.
- Amor, P. A. & Mutharia, L. M. (1995).** Cloning and expression of *rfb* genes from *Vibrio anguillarum* serotype O2 in *Escherichia coli*: evidence for cross-reactive epitopes. *Infect. Immun.* **63**, 3537-3542.
- Anderson, M. T. & Armstrong, S. K. (2004).** The BfeR regulator mediates enterobactin-inducible expression of *Bordetella enterobactin* utilization genes. *J. Bacteriol.* **186**, 7302-7311.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003).** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 215-237.
- Angelidis, P., Karagiannis, D. & Crump, E. M. (2006).** Efficacy of a *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Organ.* **71**, 19-24.
- Aoki, T., Nomura, J. & Crosa, J. H. (1985).** Virulence of *Vibrio anguillarum* with particular emphasis on the outer membrane components. *Bul. Japanese Soc. Scien. Fisheries* **55**, 1249-1254.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H. & other authors (2004).** UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **32**, D115-119.
- Arceneaux, J. E. & Byers, B. R. (1980).** Ferrisiderophore reductase activity in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **141**, 715-721.
- Arnow, L. E. (1937).** Colorimetric determination of the components of 3,4 dihydroxyphenyl-alanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* **118**, 531-537.

- Azpiroz, M. F. & Lavina, M. (2007).** Modular structure of microcin H47 and colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother* **51**, 2412-2419.
- Bagg, A. & Neilands, J. B. (1987).** Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**, 5471-5477.
- Baichoo, N. & Helmann, J. D. (2002).** Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* **184**, 5826-5832.
- Bate, N., Bignell, D. R. & Cundliffe, E. (2006).** Regulation of tylosin biosynthesis involving 'SARP-helper' activity. *Mol. Microbiol.* **62**, 148-156.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R. & other authors (2004).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D138-141.
- Bauer, M. E. & Welch, R. A. (1996).** Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **64**, 167-175.
- Bay, L., Larsen, J. L. & Leisner, J. J. (2006).** Distribution of three genes involved in the pJM1 iron-sequestering system in various *Vibrio anguillarum* serogroups. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**, 85-92.
- Bergman, A. M. (1909).** Die Rolle Bealenkrankheit des Aals. *Ber K. Bayer Versuchsstn.* **2**, 10-54.
- Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R. & other authors (2003).** The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* **31**, 365-370.
- Boesen, H. T., Pedersen, K., Larsen, J. L., Koch, C. & Ellis, A. E. (1999).** *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of O-antigen structure of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **67**, 294-301.
- Bolinches, J., Lemos, M. L., Fouz, B., Cambra, M., Larsen, J. L. & Toranzo, A. E. (1990).** Serological relationships among *Vibrio anguillarum* strains. *J. Aquat. Anim. Health* **2**, 21-29.
- Bordas, M. A., Balebona, M. C., Rodriguez-Maroto, J. M., Borrego, J. J. & Morinigo, M. A. (1998).** Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains towards mucus surfaces of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1573-1575.
- Bowden, T. J., Menoyo-Luque, D., Bricknell, I. R. & Wergeland, H. (2002).** Efficacy of different administration routes for vaccination against *Vibrio anguillarum* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **12**, 283-285.
- Braun, V. & Endriss, F. (2007).** Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals* **20**, 219-231.
- Braun, M., Endriss, F., Killmann, H. & Braun, V. (2003a).** In vivo reconstitution of the FhuA transport protein of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **185**, 5508-5518.

- Braun, V., Mahren, S. & Ogierman, M. (2003b).** Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 173-180.
- Braun, V., Patzer, S. I. & Hantke, K. (2002).** Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie.* **84**, 365-380.
- Braun, V., Pils, H. & Gross, P. (1994).** Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch. Microbiol.* **161**, 199-206.
- Brickman, T. J., Kang, H. Y. & Armstrong, S. K. (2001).** Transcriptional activation of *Bordetella* alcaligin siderophore genes requires the AlcR regulator with alcaligin as inducer. *J. Bacteriol.* **183**, 483-489.
- Brickman, T. J. & McIntosh, M. A. (1992).** Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J. Biol. Chem.* **267**, 12350-12355.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J. & Griffiths, E. (1978).** Role of iron in bacterial infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **80**, 1-35.
- Buss, K., Muller, R., Dahm, C., Gaitatzis, N., Skrzypczak-Pietraszek, E., Lohmann, S., Gassen, M. & Leistner, E. (2001).** Clustering of isochorismate synthase genes *menF* and *entC* and channeling of isochorismate in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1522**, 151-157.
- Butterton, J. R., Stoeber, J. A., Payne, S. M. & Calderwood, S. B. (1992).** Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of *viuA*, the gene encoding the ferric vibriobactin receptor of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **174**, 3729-3738.
- Calderwood, S. B. & Mekalanos, J. J. (1988).** Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid. *J. Bacteriol.* **170**, 1015-1017.
- Camakaris, J. & Pittard, J. (1974).** Purification and properties of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid-7-phosphate synthetase (*trp*) from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **120**, 590-597.
- Challis, G. L. (2005).** A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBiochem.* **6**, 601-611.
- Challis, G. L., Ravel, J. & Townsend, C. A. (2000).** Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **7**, 211-224.
- Chart, H. & Trust, T. J. (1984).** Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Can. J. Microbiol.* **30**, 703-710.
- Chen, C. Y., Wu, K. M., Chang, Y. C., Chang, C. H., Tasi, H. C., Liao, T. L., Liu, Y. M., Chen, H. J., Shen, A. B., Li, J. L., Su, T. L., Shao, C. P., Lee, C. T., Hor, L. I. & Tsai, S. F. (2003).** Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* **13**, 2577-2587.
- Chen, Q. & Crosa, J. H. (1996).** Antisense RNA, *fur*, iron, and the regulation of iron transport genes in *Vibrio anguillarum*. *J. Biol. Chem.* **271**, 18885-18891.

- Clarke, T. E., Braun, V., Winkelmann, G., Tari, L. W. & Vogel, H. J. (2002).** X-ray crystallographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. *J. Biol. Chem.* **277**, 13966-13972.
- Colwell, R. R. & Grimes, D.J. (1984).** *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgoländer Meeresunters.* **37**, 265-287.
- Conchas, R. F., Lemos, M. L., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1991).** Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2956-2962.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. & Brick, P. (1997).** Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* **16**, 4174-4183.
- Coote, J. G. (1992).** Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **8**, 137-161.
- Cox, C. D. (1980).** Iron reductases from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **141**, 199-204.
- Crosa, J. H. (1997).** Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 319-336.
- Crosa, J. H. & Hodges, L. L. (1981).** Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *Infect. Immun.* **31**, 223-227.
- Crosa, J. H., Hodges, L. L. & Schiewe, M. H. (1980).** Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **27**, 897-902.
- Crosa, J. H., Schiewe, M. H. & Falkow, S. (1977).** Evidence for plasmid contribution to the virulence of fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **18**, 509-513.
- Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002).** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 223-249.
- Crouch, M. L., Castor, M., Karlinsey, J. E., Kalhorn, T. & Fang, F. C. (2008).** Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **67**, 971-983.
- Dailey, H. A., Jr. & Lascelles, J. (1977).** Reduction of iron and synthesis of protoheme by *Spirillum itersonii* and other organisms. *J. Bacteriol.* **129**, 815-820.
- Dale, S. E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G. & Heinrichs, D. E. (2004).** Role of siderophore biosynthesis in virulence of *Staphylococcus aureus*: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore. *Infect. Immun.* **72**, 29-37.
- Dancis, A. (1998).** Genetic analysis of iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Pediatr.* **132**, S24-29.

- Dassa, E. & Bouige, P. (2001).** The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* **152**, 211-229.
- de Lorenzo, V., Bindereif, A., Paw, B. H. & Neilands, J. B. (1986).** Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **165**, 570-578.
- de Lorenzo, V. & Martinez, J. L. (1988).** Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 621-629.
- de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M. & Neilands, J. B. (1987).** Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J. Bacteriol.* **169**, 2624-2630.
- Dean, C. R., Neshat, S. & Poole, K. (1996).** PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**, 5361-5369.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2001).** The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **42**, 1297-1309.
- Denkin, S. M. & Nelson, D. R. (2004).** Regulation of *Vibrio anguillarum empA* metalloprotease expression and its role in virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4193-4204.
- Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Thomas, X., Djediat, C. & Rebuffat, S. (2006).** Parasitism of iron-siderophore receptors of *Escherichia coli* by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. *Biometals* **19**, 181-191.
- Di Lorenzo, M., Stork, M., Tolmasky, M. E., Actis, L. A., Farrell, D., Welch, T. J., Crosa, L. M., Wertheimer, A. M., Chen, Q., Salinas, P., Waldbeser, L. & Crosa, J. H. (2003).** Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J. Bacteriol.* **185**, 5822-5830.
- Di Vincenzo, L., Grgurina, I. & Pascarella, S. (2005).** In silico analysis of the adenylation domains of the freestanding enzymes belonging to the eucaryotic nonribosomal peptide synthetase-like family. *FEBS J.* **272**, 929-941.
- Dong, L., Miller, M. J. & Mollmann, U. (2004).** Microbial growth promotion studies of exochelin MN and analogues thereof. *Biometals* **17**, 99-104.
- Dorsey, C. W., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H. & Actis, L. A. (2003).** Genetic organization of an *Acinetobacter baumannii* chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport. *Microbiology* **149**, 1227-1238.
- Earhart, C. F. (1996).** Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. In *Cellular and Molecular Biology*, pp. 1075-1090. Edited by F.C.N.A. others. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Ehmann, D. E., Shaw-Reid, C. A., Losey, H. C. & Walsh, C. T. (2000).** The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 2509-2514.

- Enz, S., Mahren, S., Stroehler, U. H. & Braun, V. (2000).** Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 637-646.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1998).** Binding of the *fur* (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J. Mol. Biol.* **283**, 537-547.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1999).** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**, 6223-6229.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (2000).** Evidence of an unusually long operator for the *fur* repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 24709-24714.
- Felsenstein, J. (1996).** Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. *Meth. Enzymol.* **266**, 418-427.
- Ferguson, A. D., Braun, V., Fiedler, H. P., Coulton, J. W., Diederichs, K. & Welte, W. (2000).** Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Sci.* **9**, 956-963.
- Ferguson, A. D. & Deisenhofer, J. (2004).** Metal import through microbial membranes. *Cell* **116**, 15-24.
- Ferguson, A. D., Kodding, J., Walker, G., Bos, C., Coulton, J. W., Diederichs, K., Braun, V. & Welte, W. (2001).** Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA. *Structure* **9**, 707-716.
- Fetherston, J. D., Bearden, S. W. & Perry, R. D. (1996).** YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol. Microbiol.* **22**, 315-325.
- Fischbach, M. A., Walsh, C. T. & Clardy, J. (2008).** The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 4601-4608.
- Fischer, E., Strehlow, B., Hartz, D. & Braun, V. (1990).** Soluble and membrane-bound ferrisiderophore reductases of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* **153**, 329-336.
- Franza, T., Mahe, B. & Expert, D. (2005).** *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol. Microbiol.* **55**, 261-275.
- Funahashi, T., Moriya, K., Uemura, S., Miyoshi, S., Shinoda, S., Narimatsu, S. & Yamamoto, S. (2002).** Identification and characterization of *pvuA*, a gene encoding the ferric vibrioferrin receptor protein in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **184**, 936-946.
- Furrer, J. L., Sanders, D. N., Hook-Barnard, I. G. & McIntosh, M. A. (2002).** Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol. Microbiol.* **44**, 1225-1234.

- Gaille, C., Kast, P. & Haas, D. (2002).** Salicylate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. *J. Biol. Chem.* **277**, 21768-21775.
- Gaille, C., Reimmann, C. & Haas, D. (2003).** Isochorismate synthase (PchA), the first and rate-limiting enzyme in salicylate biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **278**, 16893-16898.
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K. & Ramos, J. L. (1997).** Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 393-410.
- Garcia, T., Otto, K., Kjelleberg, S. & Nelson, D. R. (1997).** Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1034-1039.
- Genco, C. A. & Dixon, D. W. (2001).** Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* **39**, 1-11.
- Ghosh, J. & Postle, K. (2005).** Disulphide trapping of an in vivo energy-dependent conformation of *Escherichia coli* TonB protein. *Mol. Microbiol.* **55**, 276-288.
- Giraud, E., Douet, D. G., Le Bris, H., Bouju-Albert, A., Donnay-Moreno, C., Thorin, C. & Pouliquen, H. (2006).** Survey of antibiotic resistance in an integrated marine aquaculture system under oxolinic acid treatment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**, 439-448.
- Goldberg, M. B., Boyko, S. A., Butters, J. R., Stoeckner, J. A., Payne, S. M. & Calderwood, S. B. (1992).** Characterization of a *Vibrio cholerae* virulence factor homologous to the family of TonB-dependent proteins. *Mol. Microbiol.* **6**, 2407-2418.
- González, S. F., Osorio, C. R. & Santos, Y. (2003).** Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. *Dis. Aquat. Organ.* **55**, 109-115.
- Griffith, J. K., Baker, M. E., Rouch, D. A., Page, M. G., Skurray, R. A., Paulsen, I. T., Chater, K. F., Baldwin, S. A. & Henderson, P. J. (1992).** Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 684-695.
- Gudding, R., Lillehaug, A. & Evensen, O. (1999).** Recent developments in fish vaccinology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **72**, 203-212.
- Gudmundsdottir, A., Bell, P. E., Lundrigan, M. D., Bradbeer, C. & Kadner, R. J. (1989).** Point mutations in a conserved region (TonB box) of *Escherichia coli* outer membrane protein BtuB affect vitamin B12 transport. *J. Bacteriol.* **171**, 6526-6533.
- Guerinot, M. L. (1994).** Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 743-772.
- Hale, T. L. (1991).** Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol. Rev.* **55**, 206-224.
- Hancock, R. E., Hantke, K. & Braun, V. (1977).** Iron transport in *Escherichia coli* K-12. 2,3-Dihydroxybenzoate-promoted iron uptake. *Arch. Microbiol.* **114**, 231-239.

- Hantke, K. (1981).** Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol. Gen. Genet.* **182**, 288-292.
- Hantke, K. (1987).** Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 135-139.
- Hantke, K. (1990).** Dihydroxybenzoylserine: a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**, 5-8.
- Hantke, K. (2001).** Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172-177.
- Harrison, A. J., Yu, M., Gardenborg, T., Middleditch, M., Ramsay, R. J., Baker, E. N. & Lott, J. S. (2006).** The structure of MbtI from *Mycobacterium tuberculosis*, the first enzyme in the biosynthesis of the siderophore mycobactin, reveals it to be a salicylate synthase. *J. Bacteriol.* **188**, 6081-6091.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C. & other authors (2000).** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* **406**, 477-483.
- Heller, K. J. & Schwarz, H. (1985).** Irreversible binding to the receptor of bacteriophages T5 and BF23 does not occur with the tip of the tail. *J. Bacteriol.* **162**, 621-625.
- Henderson, D. P. & Payne, S. M. (1993).** Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. *Mol. Microbiol.* **7**, 461-469.
- Higgs, P. I., Letain, T. E., Merriam, K. K., Burke, N. S., Park, H., Kang, C. & Postle, K. (2002).** TonB interacts with nonreceptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 1640-1648.
- Hirono, I., Masuda, T. & Aoki, T. (1996).** Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.* **21**, 173-182.
- Hodgson, D. A. (2000).** Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **42**, 47-238.
- Inamura, H., Muroga, K. & Nakai, T. (1984).** Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathol.* **19**, 89-96.
- Jansen, R., Briare, J., Kamp, E. M., Gielkens, A. L. & Smits, M. A. (1993).** Structural analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I (ApxI) operon. *Infect. Immun.* **61**, 3688-3695.
- Jessen-Marshall, A. E., Paul, N. J. & Brooker, R. J. (1995).** The conserved motif, GXXX(D/E)(R/K)XG[X](R/K)(R/K), in hydrophilic loop 2/3 of the lactose permease. *J. Biol. Chem.* **270**, 16251-16257.
- Kerbarh, O., Ciulli, A., Howard, N. I. & Abell, C. (2005).** Salicylate biosynthesis: overexpression, purification, and characterization of Irp9, a bifunctional salicylate synthase from *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **187**, 5061-5066.
- Kerr, I. D. (2002).** Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**, 47-64.

- Kingsley, R., Rabsch, W., Stephens, P., Roberts, M., Reissbrodt, R. & Williams, P. H. (1995). Iron supplying systems of *Salmonella* in diagnostics, epidemiology and infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **11**, 257-264.
- Kodama, H., Moustafa, M., Ishiguro, S., Mikami, T. & Izawa, H. (1984). Extracellular virulence factors of fish *Vibrio*: relationships between toxic material, hemolysin, and proteolytic enzyme. *Am. J. Vet. Res.* **45**, 2203-2207.
- Koster, W. L., Actis, L. A., Waldbeser, L. S., Tolmasky, M. E. & Crosa, J. H. (1991). Molecular characterization of the iron transport system mediated by the pJM1 plasmid in *Vibrio anguillarum* 775. *J. Biol. Chem.* **266**, 23829-23833.
- Larsen, J. L., Pedersen, K. & Dalsgaard, I. (1994). *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. *J. Fish Dis.* **17**, 259-267.
- Larsen, M. H. & Boesen, H. T. (2001). Role of flagellum and chemotactic motility of *Vibrio anguillarum* for phagocytosis by and intracellular survival in fish macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 149-152.
- Lautru, S. & Challis, G. L. (2004). Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* **150**, 1629-1636.
- Lautru, S., Oves-Costales, D., Pernodet, J. L. & Challis, G. L. (2007). MbtH-like protein-mediated cross-talk between non-ribosomal peptide antibiotic and siderophore biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* M145. *Microbiology* **153**, 1405-1412.
- Lavrrar, J. L. & McIntosh, M. A. (2003). Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *J. Bacteriol.* **185**, 2194-2202.
- Le, T. X., Munekage, Y. & Kato, S. (2005). Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Sci. Total Environ.* **349**, 95-105.
- Lemos, M. L. & Osorio, C. R. (2007). Heme, an iron supply for vibrios pathogenic for fish. *Biometals* **20**, 615-626.
- Lemos, M. L., Salinas, P., Toranzo, A. E., Barja, J. L. & Crosa, J. H. (1988). Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **170**, 1920-1925.
- Liang, N., Wu, H., Ye, J., Xu, P., Zhang, Y. & Zhang, H. (2007). Molecular cloning of an insertion sequence-like element from *Vibrio anguillarum* and its functional identification in *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* **29**, 1951-1957.
- Lin, H., Fischbach, M. A., Liu, D. R. & Walsh, C. T. (2005). In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11075-11084.
- Lin, W., Fullner, K. J., Clayton, R., Sexton, J. A., Rogers, M. B., Calia, K. E., Calderwood, S. B., Fraser, C. & Mekalanos, J. J. (1999). Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1071-1076.

Litwin, C. M. & Byrne, B. L. (1998). Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. *Infect. Immun.* **66**, 3134-3141.

Litwin, C. M. & Quackenbush, J. (2001). Characterization of a *Vibrio vulnificus* LysR homologue, HupR, which regulates expression of the haem uptake outer membrane protein, HupA. *Microb. Pathog.* **31**, 295-307.

Lundrigan, M. D. & Kadner, R. J. (1986). Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. *J. Biol. Chem.* **261**, 10797-10801.

Macdonell, M. T. & Colwell, R. R. (1985). Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 171-182.

Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology.* **154**, 3609-3623.

Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K. & other authors (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**, 743-749.

Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997). Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2651-2674.

Martinez, M., Ugalde, R. A. & Almirón, M. (2006). Irr regulates brucebactin and 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis, and is implicated in the oxidative stress resistance and intracellular survival of *Brucella abortus*. *Microbiology* **152**, 2591-2598.

Massé, E., Majdalani, N. & Gottesman, S. (2003). Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 120-124.

Mazoy, R., Botana L. M. & Lemos, M. L. (1997). Iron uptake from ferric citrate by *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**, 145-150.

Mazoy, R. & Lemos, M. L. (1991). Iron-binding proteins and heme compounds as iron sources for *Vibrio anguillarum*. *Curr. Microbiol.* **23**, 221-226.

Mazoy, R. & Lemos, M. L. (1996a). Ferric-reductase activities in whole cells and cell fractions of *Vibrio (Listonella) anguillarum*. *Microbiology* **142**, 3187-3193.

Mazoy, R. & Lemos, M. L. (1996b). Identification of heme-binding proteins in the cell membranes of *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**, 265-270.

Mazoy, R., López, E. M., Fouz, B., Amaro, C. & Lemos, M. L. (1999). Ferric-reductase activities in *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**, 205-211.

Mazoy, R., Osorio, C. R., Toranzo, A. E. & Lemos, M. L. (2003). Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Arch. Microbiol.* **179**, 329-338.

- Mazoy, R., Vázquez, F. & Lemos, M. L. (1996).** Isolation of heme-binding proteins from *Vibrio anguillarum* using affinity chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 19-23.
- McGee, K., Horstedt, P. & Milton, D. L. (1996).** Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **178**, 5188-5198.
- Michel, L., González, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T. & Reimann, C. (2005).** PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol. Microbiol.* **58**, 495-509.
- Miethke, M., Westers, H., Blom, E. J., Kuipers, O. P. & Marahiel, M. A. (2006).** Iron starvation triggers the stringent response and induces amino acid biosynthesis for bacillibactin production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**, 8655-8657.
- Miller, M. J., Zhu, H., Xu, Y., Wu, C., Walz, A. J., Vergne, A., Roosenberg, J. M., Moraski, G., Minnick, A. A., McKee-Dolence, J., Hu, J., Fennell, K., Dolence, E. K., Dong, L., Franzblau, S., Malouin F. & Möllmann, U. (2009).** Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. *Biometals* **22**, 61-75.
- Milton, D. L., Norqvist, A. & Wolf-Waltz, H. (1992).** Cloning of metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **174**, 7235-7244.
- Milton, D. L., O'Toole, R., Horstedt, P. & Wolf-Watz, H. (1996).** Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **178**, 1310-1319.
- Mouriño, S., Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2004).** Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **186**, 6159-6167.
- Mouriño, S., Rodríguez-Ares, I., Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2005).** Genetic variability of the heme uptake system among different strains of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*: identification of a new heme receptor. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8434-8441.
- Moussatova, A., Kandt, C., O'Mara, M. L. & Tieleman, D. P. (2008).** ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**, 1757-1771.
- Muiño, L., Lemos, M. L. & Santos, Y. (2001).** Presence of high-affinity iron uptake systems in fish-isolated and environmental strains of *Vibrio anguillarum* serotype O3. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 79-83.
- Myhr, E., Larsen, J. L., Lillehaug, A., Gudding, R., Heum, M. & Hastein, T. (1991).** Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2750-2757.
- Naka, H., López, C. S. & Crosa, J. H. (2008).** Reactivation of the vanchrobactin siderophore system of *Vibrio anguillarum* by removal of a chromosomal insertion sequence originated in plasmid pJM1 encoding the anguibactin siderophore system. *Environ. Microbiol.* **10**, 265-277.

Nau, C. D. & Konisky, J. (1989). Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequences of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J. Bacteriol.* **171**, 1041-1047.

Nearhos, S. P. & Fuerst, J. A. (1987). Reanalysis of 5S rRNA sequence data for the *Vibrionaceae* with the clustan program suite. *Curr. Microbiol.* **15**, 329-335.

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**, 26723-26726.

Norqvist, A., Norrman, B. & Wolf-Watz, H. (1990). Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **58**, 3731-3736.

Norqvist, A. & Wolf-Watz, H. (1993). Characterization of a novel chromosomal virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheath antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **61**, 2434-2444.

O'Brien, I. G. & Gibson, F. (1970). The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **215**, 393-402.

O'Malley, S. M., Mouton, S. L., Occhino, D. A., Deanda, M. T., Rashidi, J. R., Fuson, K. L., Rashidi, C. E., Mora, M. Y., Payne, S. M., & Henderson, D. P. (1999). Comparison of the heme iron utilization systems of pathogenic *Vibrios*. *J. Bacteriol.* **181**, 3594-3598.

O'Toole, R., Lundberg, S., Fredriksson, S. A., Jansson, A., Nilsson, B. & Wolf-Watz, H. (1999). The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *J. Bacteriol.* **181**, 4308-4317.

O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P. E. & Wolf-Watz, H. (2004). Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.* **37**, 41-46.

Occhino, D. A., Wyckoff, E. E., Henderson, D. P., Wrona, T. J. & Payne, S. M. (1998). *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* **29**, 1493-1507.

Ogierman, M. & Braun, V. (2003). Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: studies of the FecA TonB box. *J. Bacteriol.* **185**, 1870-1885.

Olsen, J. E. & Larsen, J. L. (1993). Ribotypes and plasmid contents of *Vibrio anguillarum* strains in relation to serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3863-3870.

Olsson, J. C., Jöborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S. & Conway, P. L. (1996). Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*? *J. Fish Dis.* **19**, 225-234.

Olsson, J. C., Jöborn, A., Westerdahl, A., Bomberg, L., Kjelleberg, S. & Conway, P. L. (1998). Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. *J. Fish Dis.* **21**, 1-9.

- Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R. & Milton, D. L. (2000).** Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **182**, 2326-2328.
- Osorio, C. R., Juiz-Rio, S. & Lemos, M. L. (2006).** A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Microbiology* **152**, 3327-3341.
- Osorio, C. R. & Toranzo, A. E. (2002).** DNA-based diagnostics in sea-farming. Recent Advances in Marine Biotechnology (Seafood safety and human health): Vol. 7. Co., O.I.P. (ed) New Delhi, India, pp.253-310.
- Palm, R. C., Jr., Landolt, M. L. & Busch, R. A. (1998).** Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.* **33**, 157-166.
- Panina, E. M., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2001).** Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in gamma-proteobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 529-543.
- Panina, E. M., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2003).** Regulation of biosynthesis and transport of aromatic amino acids in low-GC Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**, 211-220.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. (1998).** Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1-34.
- Patzer, S. I., Baquero, M. R., Bravo, D., Moreno, F. & Hantke, K. (2003).** The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology* **149**, 2557-2570.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H., Dunstan, S. J. & Skurray, R. A. (1995).** Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC. *J. Bacteriol.* **177**, 2827-2833.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H. & Skurray, R. A. (1996).** Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**, 575-608.
- Pawelek, P. D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C. M., Moiseeva, N., Allaire, M. & Coulton, J. W. (2006).** Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science* **312**, 1399-1402.
- Pazos, F., Santos, Y., Magariños, B., Bandin, I., Nuñez, S. & Toranzo, A. E. (1993).** Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2969-2976.
- Pecqueur, L., D'Autreaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I. & Bersch, B. (2006).** Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **281**, 21286-21295.

- Pedersen, K., Grisez, L., van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F. & Larsen, J. L. (1999a).** Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Curr. Microbiol.* **38**, 183-189.
- Pedersen, K., Kuhn, I., Seppanen, J., Hellstrom, A., Tiainen, T., Rimaila-Parnanen, E. & Larsen, J. L. (1999b).** Clonality of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish from the *Scandinavian countries*, Sweden, Finland and Denmark. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 337-347.
- Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C. A., Schubert, S. & Heesemann, J. (1998).** The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J. Bacteriol.* **180**, 538-546.
- Persmark, M., Expert, D. & Neilands, J. B. (1989).** Isolation, characterization, and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Biol. Chem.* **264**, 3187-3193.
- Persmark, M., Expert, D. & Neilands, J. B. (1992).** Ferric iron uptake in *Erwinia chrysanthemi* mediated by chrysobactin and related catechol-type compounds. *J. Bacteriol.* **174**, 4783-4789.
- Pettis, G. S. & McIntosh, M. A. (1987).** Molecular characterization of the *Escherichia coli* enterobactin cistron *entF* and coupled expression of *entF* and the *fes* gene. *J. Bacteriol.* **169**, 4154-4162.
- Pittard, J., Camakaris, H. & Yang, J. (2005).** The TyrR regulon. *Mol. Microbiol.* **55**, 16-26.
- Plancon, L., Janmot, C., le Maire, M., Desmadril, M., Bonhivers, M., Letellier, L. & Boulanger, P. (2002).** Characterization of a high-affinity complex between the bacterial outer membrane protein FhuA and the phage T5 protein pb5. *J. Mol. Biol.* **318**, 557-569.
- Poch, M. T. & Johnson, W. (1993).** Ferric reductases of *Legionella pneumophila*. *Biometals* **6**, 107-114.
- Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M. L. (2003).** Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* **47**, 903-915.
- Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (1998).** Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. *J. Biol. Chem.* **273**, 22420-22427.
- Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (1999).** Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J. Mol. Biol.* **285**, 1145-1156.
- Pollack, J. R., Ames, B. N. & Neilands, J. B. (1970).** Iron transport in *Salmonella typhimurium*: mutants blocked in the biosynthesis of enterobactin. *J. Bacteriol.* **104**, 635-639.
- Postle, K. & Kadner, R. J. (2003).** Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**, 869-882.

- Quadri, L. E., Sello, J., Keating, T. A., Weinreb, P. H. & Walsh, C. T. (1998).** Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem. Biol.* **5**, 631-645.
- Rabsch, W., Methner, U., Voigt, W., Tschape, H., Reissbrodt, R. & Williams, P. H. (2003).** Role of receptor proteins for enterobactin and 2,3-dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **71**, 6953-6961.
- Ratlledge, C. (1971).** Transport of iron by mycobactin in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 856-862.
- Ratlledge, C. & Dover, L. G. (2000).** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 881-941.
- Ratlledge, C. & Winder, F. G. (1962).** The accumulation of salicylic acid by mycobacteria during growth on an iron-deficient medium. *Biochem. J.* **84**, 501-506.
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W. & Huson, D. H. (2005).** Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res.* **33**, 5799-5808.
- Rauscher, L., Expert, D., Matzanke, B. F. & Trautwein, A. X. (2002).** Chrysobactin-dependent iron acquisition in *Erwinia chrysanthemi*. Functional study of a homolog of the *Escherichia coli* ferric enterobactin esterase. *J. Biol. Chem.* **277**, 2385-2395.
- Raymond, K. N., Dertz, E. A. & Kim, S. S. (2003).** Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3584-3588.
- Reichert, J., Sakaitani, M. & Walsh, C. T. (1992).** Characterization of EntF as a serine-activating enzyme. *Protein Sci.* **1**, 549-556.
- Rodkhum, C., Hirono, I., Crosa, J. H. & Aoki, T. (2005).** Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout. *Microb. Pathog.* **39**, 109-119.
- Rodkhum, C., Hirono, I., Stork, M., Di Lorenzo, M., Crosa, J. H. & Aoki, T. (2006).** Putative virulence-related genes in *Vibrio anguillarum* identified by random genome sequencing. *J. Fish Dis.* **29**, 157-166.
- Rohrbach, M. R., Braun, V. & Koster, W. (1995).** Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12: altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. *J. Bacteriol.* **177**, 7186-7193.
- Roman, D. G., Dancis, A., Anderson, G. J. & Klausner, R. D. (1993).** The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the *gp91-phox* subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4342-4350.
- Rusnak, F., Sakaitani, M., Drucekhammer, D., Reichert, J. & Walsh, C. T. (1991).** Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the *entF* gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry.* **30**, 2916-2927.

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Samuelsen, O. B. & Bergh, Ø. (2004). Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* **235**, 27-35.

Samuelsen, O. B., Bergh, O. & Ervik, A. (2003). Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*. *Dis. Aquat. Organ.* **56**, 127-133.

Santos, Y., Pazos, F., Bandin, I. & Toranzo, A. E. (1995). Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2, and O3. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2493-2498.

Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 597-626.

Schiewe, M. H., Trust, T. J. & Crosa, J. H. (1981). *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of vibriosis in fish. *Curr. Microbiol.* **6**, 343-348.

Schwarzer, D., Finking, R. & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 275-287.

Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56.

Shao, M., Ma, Y., Liu, Q. & Zhang, Y. (2005). Secretory expression of recombinant proteins in an attenuated *Vibrio anguillarum* strain for potential use in vaccines. *J. Fish Dis.* **28**, 723-728.

Soengas, R. G., Anta, C., Espada, A., Nieto, R. M., Larrosa, M., Rodríguez, J. & Jiménez, C. (2007). Vanchrobactin: absolute configuration and total synthesis. *Tetrahedron Lett.* **48**, 3021-3024.

Soengas, R. G., Anta, C., Espada, A., Paz, V., Ares, I. R., Balado, M., Rodríguez, J., Lemos, M. L. & Jimenez, C. (2006). Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Tetrahedron Lett.* **47**, 7113-7116.

Soengas, R. G., Larrosa, M., Balado, M., Rodríguez, J., Lemos, M. L. & Jimenez, C. (2008). Synthesis and biological activity of analogues of vanchrobactin, a siderophore from *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 1278-1287.

Sørensen, U. B. & Larsen, J. L. (1986). Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 593-597.

Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493-505.

Stack, T. D. P., Hou, Z. & Raymond, K. N. (1993). Rational reduction of the conformational space of a siderophore analog through nonbonded interactions: the role of entropy in enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6466-6467.

- Stojiljkovic, I., Baumber, A. J. & Hantke, K. (1994).** Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a *fur* titration assay. *J. Mol. Biol.* **236**, 531-545.
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Mouriño, S., Osorio, C. R., Lemos, M. L. & Crosa, J. H. (2004).** Two *tonB* systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence. *Infect. Immun.* **72**, 7326-7329.
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T. J. & Crosa, J. H. (2007a).** Transcription termination within the iron transport-biosynthesis operon of *Vibrio anguillarum* requires an antisense RNA. *J. Bacteriol.* **189**, 3479-3488.
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T. J., Crosa, L. M. & Crosa, J. H. (2002).** Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* **48**, 222-228.
- Stork, M., Otto, B. R. & Crosa, J. H. (2007b).** A novel protein, TtpC, is a required component of the TonB2 complex for specific iron transport in the pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **189**, 1803-1815.
- Stroeher, U. H., Jedani, K. E. & Manning, P. A. (1998).** Genetic organization of the regions associated with surface polysaccharide synthesis in *Vibrio cholerae* O1, O139 and *Vibrio anguillarum* O1 and O2: a review. *Gene* **223**, 269-282.
- Tait, G. H. (1975).** The identification and biosynthesis of siderochromes formed by *Micrococcus denitrificans*. *Biochem. J.* **146**, 191-204.
- Thomas, X., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J. & other authors (2004).** Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 28233-28242.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Tilbrook, G. S. & Hider, R. C. (1998).** Iron chelators for clinical use. *Met. Ions Biol. Syst.* **35**, 691-730.
- Timmerman, M. M. & Woods, J. P. (2001).** Potential role for extracellular glutathione-dependent ferric reductase in utilization of environmental and host ferric compounds by *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **69**, 7671-7678.
- Tolmasky, M. E., Actis, L. A. & Crosa, J. H. (1988).** Genetic analysis of the iron uptake region of the *Vibrio anguillarum* plasmid pJM1: molecular cloning of genetic determinants encoding a novel trans activator of siderophore biosynthesis. *J. Bacteriol.* **170**, 1913-1919.
- Tolmasky, M. E., Actis, L. A. & Crosa, J. H. (1993).** A single amino acid change in AngR, a protein encoded by pJM1-like virulence plasmids, results in hyperproduction of anguibactin. *Infect. Immun.* **61**, 3228-3233.

Tolmasky, M. E., Actis, L. A., Toranzo, A. E., Barja, J. L. & Crosa, J. H. (1985). Plasmids mediating iron uptake in *Vibrio anguillarum* strains isolated from turbot in Spain. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1989-1997.

Tolmasky, M. E. & Crosa, J. H. (1995). Iron transport genes of the pJM1-mediated iron uptake system of *Vibrio anguillarum* are included in a transposonlike structure. *Plasmid* **33**, 180-190.

Tolmasky, M. E. & Crosa, J. H. (1991). Regulation of plasmid-mediated iron transport and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Biol. Met.* **4**, 33-35.

Tolmasky, M. E., Wertheimer, A. M., Actis, L. A. & Crosa, J. H. (1994). Characterization of the *Vibrio anguillarum* *fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *J. Bacteriol.* **176**, 213-220.

Toranzo, A. E. & Barja, J. L. (1990). A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with spetial reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat Org.* **9**, 73-82.

Toranzo, A. E. & Barja, J. L. (1993). Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annu. Rev Fish. Dis.* **1993**, 5-36.

Toranzo, A. E., Barja, J. L., Colwell, R. R. & Hetrick, F. M. (1983a). Characterization of plasmids in bacterial fish pathogen. *Infect. Immun.* **39**, 184-192.

Toranzo, A. E., Barja, J. L., Potter, S., Colwell, R. R., Hetrick, F. M. & Crosa, J. H. (1983b). Hemagglutination, hemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the atlatic coast. *FEMS Microbiol. Lett.* **18**, 257-262.

Toranzo, A. E., Barja, J. L., Potter, S. A., Colwell, R. R., Hetrick, F. M. & Crosa, J. H. (1983c). Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infect. Immun.* **39**, 1220-1227.

Toranzo, A. E., Magariños, B. & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**, 37-61.

Toranzo, A. E., Santos, Y. & Barja, J. L. (1997). Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. *Dev. Biol. Stand.* **90**, 93-105.

Toranzo, A.E., Santos, Y., Lemos, M. L., Ledo, A. & Bolinches, J. (1987). Homology of *Vibrio anguillarum* strains causing epizootics in turbot, salmon, and trout reared on the Atlantic coast of Spain. *Aquaculture* **67**, 41-52.

Tusnady, G. E. & Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**, 849-850.

Vasil, M. L., Ochsner, U. A., Johnson, Z., Colmer, J. A. & Hamood, A. N. (1998). The *fur*-regulated gene encoding the alternative sigma factor PvdS is required for iron-dependent expression of the LysR-type regulator *ptxR* in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**, 6784-6788.

- Vezzi, A., Campanaro, S., D'Angelo, M. & other authors (2005).** Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science* **307**, 1459-1461.
- Vik-Mo, F. T., Bergh, O. & Samuelson, O. B. (2005).** Efficacy of orally administered flumequine in the treatment of vibriosis caused by *Listonella anguillarum* in atlantic cod *Gadus morhua*. *Dis. Aquat. Organ.* **67**, 87-92.
- von Dohren, H., Dieckmann, R. & Pavela-Vrancic, M. (1999).** The nonribosomal code. *Chem. Biol.* **6**, R273-279.
- Walsh, C. T., Liu, J., Rusnak, F. & Sakaitani, M. (1990).** Molecular studies on enzymes in chorismate metabolism and enterobactin biosynthetic pathway. *Chem. Rev.* **90**, 1105-1129.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004).** Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 611-647.
- Wang, X. H., Oon, H. L., Ho, G. W., Wong, W. S., Lim, T. M. & Leung, K. Y. (1998).** Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in *Vibrio*-fish epithelial cell interactions. *Microbiology* **144**, 2987-3002.
- Watnick, P. I., Butterton, J. R. & Calderwood, S. B. (1998).** The interaction of the *Vibrio cholerae* transcription factors, Fur and IrgB, with the overlapping promoters of two virulence genes, *irgA* and *irgB*. *Gene*. **209**, 65-70.
- Webster, A. C. & Litwin, C. M. (2000).** Cloning and characterization of *vuuA*, a gene encoding the *Vibrio vulnificus* ferric vulnibactin receptor. *Infect. Immun.* **68**, 526-534.
- Welch, T. J., Chai, S. & Crosa, J. H. (2000).** The overlapping *angB* and *angG* genes are encoded within the trans-acting factor region of the virulence plasmid in *Vibrio anguillarum*: essential role in siderophore biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**, 6762-6773.
- Welch, T. J. & Crosa, J. H. (2005).** Novel role of the lipopolysaccharide O1 side chain in ferric siderophore transport and virulence of *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **73**, 5864-5872.
- Wertheimer, A. M., Verweij, W., Chen, Q., Crosa, L. M., Nagasawa, M., Tolmasky, M. E., Actis, L. A. & Crosa, J. H. (1999).** Characterization of the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. *Infect. Immun.* **67**, 6496-6509.
- Wilderman, P. J., Sowa, N. A., FitzGerald, D. J., FitzGerald, P. C., Gottesman, S., Ochsner, U. A. & Vasil, M. L. (2004).** Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9792-9797.
- Winkelmann, G. & Van der Helm, D. (1987).** Iron Transport in Microbes, Plants and Animals: VCH, New York, New York, U.S.A.
- Wolf, M. K. & Crosa, J. H. (1986).** Evidence for the role of a siderophore in promoting *Vibrio anguillarum* infections. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2949-2952.

Wu, H. Z., Zhang, H. Z., Lu, C. X., Liang, N., Jin, H. Y., Ma, Y. & Zhang, Y. X. (2003). DNA sequencing of a plasmid with virulence from marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **35**, 956-959.

Wyckoff, E. E., Mey, A. R. & Payne, S. M. (2007). Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *Biomaterials* **20**, 405-416.

Wyckoff, E. E., Smith, S. L. & Payne, S. M. (2001). VibD and VibH are required for late steps in vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **183**, 1830-1834

Yang, J., Sangwan, I., Lindemann, A., Hauser, F., Hennecke, H., Fischer, H. M. & O'Brian, M. R. (2006). *Bradyrhizobium japonicum* senses iron through the status of haem to regulate iron homeostasis and metabolism. *Mol. Microbiol.* **60**, 427-437.

Yanofsky, C. (2000). Transcription attenuation: once viewed as a novel regulatory strategy. *J. Bacteriol.* **182**, 1-8.

Zhu, M., Valdebenito, M., Winkelmann, G. & Hantke, K. (2005). Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology* **151**, 2363-2372.

VII. Anexos

Correspondence
Manuel L. Lemos
mlemos@usc.es

Received 11 July 2006
Revised 16 August 2006
Accepted 17 August 2006

A gene cluster involved in the biosynthesis of vanchrobactin, a chromosome-encoded siderophore produced by *Vibrio anguillarum*

Miguel Balado, Carlos R. Osorio and Manuel L. Lemos

Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Aquaculture and Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, Campus Sur, Santiago de Compostela 15782, Spain

Vibrio anguillarum serotype O2 strains produce a catechol siderophore named vanchrobactin, which has been identified as *N*-[*N'*-(2,3-dihydroxybenzoyl)-arginy]l-serine. This work describes a chromosomal region that harbours the genetic determinants necessary for the biosynthesis of vanchrobactin. The authors have identified the genes involved in 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) biosynthesis (*vabA*, *vabB* and *vabC*) and activation (*vabE*), and a gene (*vabF*) encoding a non-ribosomal peptide synthetase, which is putatively involved in the assembly of the siderophore components. Also described are the identification and characterization of genes encoding a putative vanchrobactin exporter (*vabS*) and a siderophore esterase (*vabH*). In-frame deletion mutants in *vabA*, *vabB*, *vabC*, *vabE*, *vabF* and *vabH* were impaired for growth under conditions of iron limitation, and the analysis of culture supernatants by chrome azurol-S and cross-feeding assays showed almost no production of siderophores in any of the *vabABCEF* mutants. In addition, deletion mutations of *vabA*, *vabB* and *vabC* abolished production of DHBA, as assessed by chemical and biological analyses. Complementation of each mutant with the corresponding gene provided *in trans* confirmed the involvement of this gene cluster in the biosynthesis of DHBA and vanchrobactin in *V. anguillarum* strain RV22. Based on chemical and genetic data, and on published models for other catechol siderophores, a model for vanchrobactin biosynthesis is proposed.

INTRODUCTION

Bacterial pathogens have developed a series of mechanisms to obtain iron from the host. One of the main strategies is the synthesis and secretion of siderophores that can remove iron from the host iron-binding proteins, and internalize it to the cell (for a recent review, see Wandersman & Delepelaire, 2004).

The fish pathogen *Vibrio anguillarum* is the causative agent of vibriosis, a highly fatal haemorrhagic septicemia affecting marine and freshwater fish species throughout the world (Toranzo & Barja, 1990). Up to 23 serotypes, designated O1–O23, are recognized in the European system (Pedersen *et al.*, 1999), with O1 and O2 being the main ones implicated in disease (Toranzo *et al.*, 1997). Although the virulence mechanisms of *V. anguillarum* are not fully understood, it is known that the ability to scavenge iron

through the utilization of siderophores contributes significantly to virulence (Wolf & Crosa, 1986). Two clearly different siderophore-mediated systems have been described in *V. anguillarum* strains belonging to serotypes O1 and O2 (Conchas *et al.*, 1991). In most pathogenic strains of serotype O1, the system is mediated by the 65 kb plasmid pJM1, which harbours genes for the biosynthetic machinery, and utilization of the catecholate-type siderophore anguibactin (Stork *et al.*, 2002). Recently, it has been reported that the biosynthesis of anguibactin needs chromosomally encoded enzymes, in addition to those encoded by pJM1 genes (Alice *et al.*, 2005).

On the other hand, all serotype O2 strains tested so far, and some plasmidless serotype O1 strains, produce a siderophore that is encoded by hitherto uncharacterized chromosomal genes, and is not related to the pJM1 plasmid-mediated system (Stork *et al.*, 2002). The biological activity deduced from cross-feeding assays pointed initially to a functionality related to the *Escherichia coli* 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA)-containing siderophore enterobactin (Lemos *et al.*, 1988; Conchas *et al.*, 1991). This chromosome-encoded system produces a siderophore called vanchrobactin, which has been recently isolated from the serotype O2 strain RV22, and chemically characterized as *N*-[*N'*-(2,3-dihydroxybenzoyl)-arginy]l-serine (Soengas *et al.*, 2006).

Abbreviations: A-domain, adenylation domain; ArCP, aryl carrier protein; CAS, chrome azurol-S; DBS, 2,3-dihydroxybenzoyl-serine; DHBA, 2,3-dihydroxybenzoic acid; EDDA, ethylenediamine-di-(*o*-hydroxyphenyl-acetic acid); MFS, major facilitator superfamily; NRPS, non-ribosomal peptide synthetase; PCP, peptidyl carrier protein; TE, thioesterase.

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the nucleotide sequence reported in this paper is AM168450.

The genes necessary for DHBA biosynthesis are also present and expressed in the chromosome of the anguibactin-producing *V. anguillarum* O1 strain 775 (Chen *et al.*, 1994); in addition, a chromosomal gene cluster involved in DHBA synthesis and activation has been identified in this strain (Alice *et al.*, 2005). Most of these genes have functional homologues in the pJM1 plasmid, except *angA_{ch}* (encoding a putative 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase), which is essential for DHBA and anguibactin synthesis, and for which only the chromosomal copy seems to be functional.

Since vanchrobactin is a catechol siderophore (Lemos *et al.*, 1988; Soengas *et al.*, 2006), we hypothesized that homologues of the genes described in the chromosome of serotype O1 strains, and some additional genes, could be responsible for biosynthesis of DHBA and the siderophore produced by plasmidless *V. anguillarum* strains. Thus, the aim of this study was the identification and characterization of the genes involved in the biosynthesis of vanchrobactin.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and media. Strains and plasmids used, as well as those derived from this study, are listed in Table 1. *V. anguillarum* serotype O2 strain RV22 was routinely grown at 25 °C in tryptic soy agar and broth (Difco), supplemented with 1 %

NaCl (TSA-1 and TSB-1, respectively). *E. coli* strains were routinely grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) medium (Pronadisa) supplemented with the appropriate antibiotics. All strains were stored frozen at -80 °C in LB broth containing 20 % (v/v) glycerol. Ampicillin sodium salt and kanamycin (Sigma-Aldrich) stock solutions in ultrapure water (100 mg ml⁻¹ and 50 mg ml⁻¹, respectively) were filter-sterilized, and stored at -20 °C.

DNA manipulations. Standard DNA manipulations were carried out as described by Sambrook & Russell (2001). Total genomic DNA from *V. anguillarum* was purified with the Easy-DNA kit (Invitrogen). Plasmid DNA purification, and extraction of DNA from agarose gels, were carried out using kits from Qiagen. DNA-probe labelling and Southern blot analysis were performed with the ECL DNA-labelling and detection system (Amersham Biosciences). PCR reactions were carried out in a T-Gradient Thermal Cycler (Biometa), with *Taq* polymerase BioTaq (Bioline). For inverse PCR, chromosomal DNA was digested with a single restriction enzyme, self-ligated, and used as template in a PCR reaction with the Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics), using suitable primers.

DNA sequences were determined with the dideoxy-chain-termination method on either plasmid or PCR products using GenomeLab DTCS-Quick Start Kit with a CEQ 8000 DNA Sequencer (Beckman Coulter). Sequences were examined and assembled using BioEdit version 7.0.4.1 (Hall, 1999). The European Bioinformatics Institute and the NCBI services were used to consult the DNA and protein sequence databases with FASTA3 and BLAST algorithms. The protein families database of alignments and hidden Markov models (Pfam), of the Sanger Institute,

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or source
<i>V. anguillarum</i>		
RV22	Serotype O2 wild-type strain isolated from diseased turbot (Spain)	Lemos <i>et al.</i> (1988)
MB3	RV22 <i>vabE</i> -defective mutant	This study
MB6	RV22 <i>vabS</i> -defective mutant	This study
MB10	RV22 <i>vabC</i> -defective mutant	This study
MB11	RV22 <i>vabB</i> -defective mutant	This study
MB12	RV22 <i>vabA</i> -defective mutant	This study
MB14	RV22 <i>vabF</i> -defective mutant	This study
MB19	RV22 <i>vabH</i> -defective mutant	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE4 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Laboratory stock
S17-1- λ pir	<i>tpr smr recA thi pro hsdR-M+ RP4::2-Tc::Mu Km::Tn7 λpir</i>	Herrero <i>et al.</i> (1990)
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium		
<i>entB-1</i>	Enterobactin biosynthesis mutant; can use enterobactin as an iron source	Pollack <i>et al.</i> (1970)
<i>entB-7</i>	Enterobactin biosynthesis mutant; can use enterobactin and DHBA as iron sources	Pollack <i>et al.</i> (1970)
Plasmids		
pGEM-T Easy	PCR cloning vector, Ap ^R	Promega
pWKS30	Low-copy-number cloning vector, Ap ^R	Wang & Kushner (1991)
pNidKan	Suicide plasmid, pCVD442 derivative, <i>pir</i> , Km ^R	Mouriño <i>et al.</i> (2004)
pHRP309	Low-copy-number vector, Gm ^R	Parales & Harwood (1993)
pMB13	<i>vabA</i> gene and promoter cloned in pHRP309, Gm ^R	This study
pMB14	<i>vabC</i> gene and promoter cloned in pHRP309, Gm ^R	This study
pMB15	<i>vabF</i> gene and promoter cloned in pHRP309, Gm ^R	This study
pMB16	<i>vabH</i> gene and promoter cloned in pHRP309, Gm ^R	This study

was utilized to predict the protein domain organization (Bateman *et al.*, 2004). The prediction of transmembrane helices in proteins was carried out using program HMMTOP version 2.0 (Tusnady & Simon, 2001).

Cloning and sequencing of a gene cluster involved in vanchrobactin biosynthesis. In order to clone the genes responsible for the biosynthesis of vanchrobactin, in the chromosome of serotype O2 strain RV22, we used PCR to look for the presence of a homologue of the *angE* gene originally cloned from the chromosome of a pJM1-like plasmid-bearing *V. anguillarum* O1 strain 90-11-287 (Holmstrom & Gram, 2003). As a result, we found an ORF that showed 97% identity to the nucleotide sequence of this *angE* gene. An internal fragment of the *angE* homologue amplified in RV22 was labelled, and used as a probe in Southern hybridizations to identify suitable restriction sites surrounding this locus. This information was used to carry out an inverse PCR reaction, and a 7 kb fragment was obtained. Successive inverse PCRs and primer walking allowed us to extend sequencing in two directions to a fragment of approximately 18 kb.

Mutant construction. Gene deletions in *V. anguillarum* RV22 were constructed by using PCR amplifications of two fragments of each gene and flanking regions, which when ligated together would result in an in-frame (nonpolar) deletion (Fig. 1). The oligonucleotides used to amplify the upstream and downstream ends of each gene are listed in Table 2. Suitable restriction sites were added to the oligonucleotides. Construction of in-frame deletions of *vabA*, *vabC*, *vabE*, *vabB*, *vabS* and *vabF* was accomplished in several steps. The PCR-amplified 3'-end gene fragments were ligated into pWKS30, and resulting plasmids were cut with suitable enzymes, and ligated to the 5' ends of the PCR fragments of each gene. Each deleted allele cloned in pWKS30 was digested with *NorI* and *ApaI*, and ligated into the suicide vector pNidKan (Mourino *et al.*, 2004). As a pCVD442 derivative, pNidKan contains *R6K ori*, requiring the *pir* gene product for replication, and the *sacB* gene, conferring sucrose sensitivity. The resulting plasmids were mated from *E. coli* S17-1- λ pir into *V. anguillarum* RV22, and transformants, with the plasmid integrated in the chromosome by homologous recombination, were selected on agar medium containing 50 μ g kanamycin ml^{-1} (resistance conferred by pNidKan) and 50 μ g ampicillin ml^{-1} (specific antibiotic to select *V. anguillarum* RV22). A second recombination event was obtained by selecting for sucrose (10%) resistance. This process led to the production of the following mutant strains of *V. anguillarum*: MB12 (Δ *vabA*), MB10 (Δ *vabC*), MB3 (Δ *vabE*), MB11 (Δ *vabB*), MB6 (Δ *vabS*), MB14 (Δ *vabF*) and MB19 (Δ *vabH*). Deletion of the parental gene was verified in all cases by Southern blot hybridization. DNA sequencing of the region involved in the deletion was carried out to ensure that all constructs were in-frame.

Complementation of *V. anguillarum* mutants. The vanchrobactin biosynthetic genes *vabA*, *vabC* and *vabF*, and also the *vabH* gene, along with their own promoter sequences, were PCR amplified from *V. anguillarum* RV22 chromosome using specific primers. Suitable restriction sites were added to the oligonucleotides (Table 2). The *vabF* gene was amplified from strain MB19 (Δ *vabH*) using proFesV_*XbaI* and VacF_*XbaI* primers (Table 2) to incorporate the promoter upstream of *vabH*. The amplified DNA fragments were cloned into the pHRP309 vector (Parales & Harwood, 1993) at the appropriate restriction site, and subsequently transformed into the *E. coli* S17-1- λ pir strain. The resulting plasmids (Table 1) were mated from *E. coli* S17-1- λ pir into the corresponding *V. anguillarum* mutant, and transformants were selected on agar medium containing 10 μ g gentamicin ml^{-1} (resistance conferred by pHRP309) and 50 μ g ampicillin ml^{-1} (to select for *V. anguillarum*). The pHRP309 recombinant plasmids were isolated from the *V. anguillarum* mutants, and digested with appropriate restriction enzymes to verify the presence of the inserts.

Growth under iron-limited conditions, and test for siderophore production. To test the ability of *V. anguillarum* defective mutants to grow under iron-limited conditions, overnight cultures in LB of the parental and mutant strains were adjusted to an OD₆₀₀ of 0.5, and diluted 1:15 in CM9 minimal medium (Lemos *et al.*, 1988) containing the iron chelator ethylenediamine-di-(*o*-hydroxyphenylacetic acid) (EDDA) at 5 μ M. Cultures were incubated at 25 °C, with shaking at 150 r.p.m., and growth (OD₆₀₀) and siderophore production were measured after 22 h incubation. Siderophore production was measured using the chrome azurol-S (CAS) liquid assay (Schwyn & Neilands, 1987). In addition, the Arnow test (Arnow, 1937) was used for spectrophotometric measurement of catechol in each sample. A non-inoculated CM9 sample, containing EDDA at an appropriate concentration, was used as negative control and spectrophotometric blank for the CAS liquid assay.

Cross-feeding assays. The biological activities of the supernatants produced by the mutant strains were determined by performing cross-feeding experiments. We tested the ability of culture supernatants from *V. anguillarum* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Table 1) siderophore-defective mutants to cross-feed different indicator strains that were defective in DHBA and/or siderophore synthesis. It is known that vanchrobactin can substitute the function of enterobactin to supply iron to enterobactin-deficient mutants (Lemos *et al.*, 1988; Conchas *et al.*, 1991). Two mutants of *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 (Pollack *et al.*, 1970), which are deficient in two different biosynthetic steps of enterobactin production, were used to detect vanchrobactin and DHBA production: (i) strain *enb-7*, which can use exogenous enterobactin, vanchrobactin or

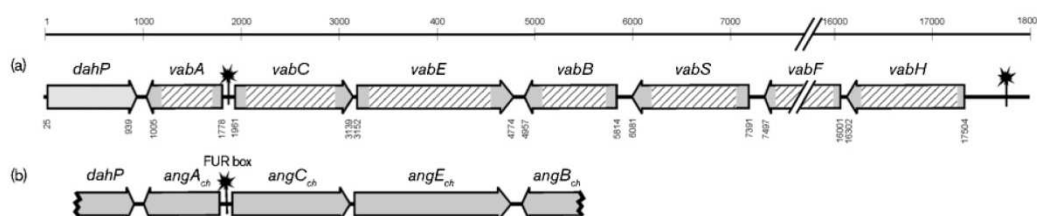


Fig. 1. Physical map of (a) the vanchrobactin biosynthesis genes of *V. anguillarum* serotype O2 strain RV22; and (b) their respective homologues, which have been described as part of the chromosomal anguibactin biosynthesis gene cluster of serotype O1 strain 775 (Alice *et al.*, 2005). The ruler at the top indicates nucleotide positions. ORFs are depicted as arrows, which indicate the direction of transcription, and the numbers displayed vertically show the start and end points of each gene. Deleted regions within each gene are shown as hatched boxes.

Table 2. Oligonucleotide primers used for mutant construction, and number of amino acids deleted

Oligonucleotide	Sequence (5'→3')*	Total no. of aa/deleted aa
<i>ΔvabE</i> mutant		541/419
<i>ΔVacE</i> 1	GCGGATCCGTGCAAAACCAACAGCGCTC	
<i>ΔVacE</i> 2	GCAGAGATAGAATTCAGCAC	
<i>ΔVacE</i> 3	GCGAATTCACATCCATTTCTGTCGATGA	
<i>ΔVacE</i> 4	GCAAGCTTCAATATCCCCGTGGTGTACA	
<i>ΔvabB</i> mutant		286/219
<i>ΔVacB</i> 1	CGGGATCCGGTCTTAATCTACGCGACGC	
<i>ΔVacB</i> 2	GCGAATTCATCGTGAATGAGCAGTACCG	
<i>ΔVacB</i> 3	GCGAATTCGAATCATGGCGCAAGATGGG	
<i>ΔVacB</i> 4	GCAAGCTTTGTACTACTCAAGGACGTC	
<i>ΔvabA</i> mutant		258/204
<i>ΔVacA</i> 1	CGTCTAGATGATCCACAACAGATTACGC	
<i>ΔVacA</i> 2	GCGGATCCTACCGCATAACCAATCCCCT	
<i>ΔVacA</i> 3	GCGGATCCGAAGACATTGCTGGGGTTGT	
<i>ΔVacA</i> 4	GCGAATTCAGGTGTACCAACAGCGACTG	
<i>ΔvabC</i> mutant		393/337
<i>ΔVacC</i> 1	GCTCTAGACAACCCAGCAATGTCTTCG	
<i>ΔVacC</i> 2	GCGGATCCCATGGTGTGTGAGGCGAAG	
<i>ΔVacC</i> 3	GCGGATCCACAGGGGCAAAATGAGCAC	
<i>ΔVacC</i> 4	GCAAGCTTCTCAATTAACGGAAGCGG	
<i>ΔvabF</i> mutant		2835/2777
<i>ΔVacF</i> 1	CGTCTAGATGGTATTGATGCTCGATGGC	
<i>ΔVacF</i> 2	CGGGATCCCCAAATACCTTGCTGTGTGC	
<i>ΔVacF</i> 3	GCGGATCCCATGAAGATATCTTGGCCCC	
<i>ΔVacF</i> 4	GCGAATTCATAAGATGAGAGCAAACCACC	
<i>ΔvabS</i> mutant		437/313
<i>ΔExpV</i> 1	GCGGATCCCTTTCATCCACTCCAACAGC	
<i>ΔExpV</i> 2	GCGAATTCCTAGCACCAACGATGTCGAT	
<i>ΔExpV</i> 3	GCGAATTCATCCAATGCCATGATAAGGCC	
<i>ΔExpV</i> 4	CGAAGCTTCAACAGCAGGGT	
<i>ΔvabH</i> mutant		401/232
<i>ΔFesV</i> 1	GCTCTAGAAGAGGATGCCAATCAGTGTG	
<i>ΔFesV</i> 2	GCGGATCCTGAATCGAAACCGAGCCACT	
<i>ΔFesV</i> 3	GCGGATCCGGTACGATCGACTCTGTGTG	
<i>ΔFesV</i> 4	GCAAGCTTGACTGATGGCATTACGCTG	
Complementations		Position
proVacA_ <i>Sma</i> I	GCCCCGGGCATCCAATAGCTGATTAGCC	2010
VacA_ <i>Sma</i> I	GCCCCGGGAGCAGCAATATTGTCAGCCC	910
proVacC_ <i>Kpn</i> I	GCGGTACCATACCGCATAACCAATCCCC	1720
VacC_ <i>Kpn</i> I	GCGGTACCGCTGAATTGCTCAGGCCAAG	3180
proFesV_ <i>Xba</i> I	GCTCTAGAATCCATGGGCTTCATGACCT	17800
FesV_ <i>Xba</i> I	CGTCTAGACAAGCATGAATGAACAGCGC	16050
VacF_ <i>Xba</i> I	GCTCTAGAGATACGCACTGGTTTCGTCG	7460

*Restriction sites used are underlined.

DHBA to overcome iron-limiting conditions; and (ii) *enb-1*, which can use only enterobactin or vancrobactin for iron supply (Conchas *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1988).

We designed two cross-feeding assays: (i) *V. anguillarum* MB10 *vabC*-defective mutant was used as an indicator strain to test MB3(*ΔvabE*), MB14(*ΔvabF*), and *S. enterica* *enb-7* and *enb-1*; (ii) *enb-7* and *enb-1* were used as indicators to test MB10(*ΔvabC*), MB3(*ΔvabE*) and MB14(*ΔvabF*) mutants. In each assay, strain RV22 was used as positive

control. Each indicator strain was inoculated into CM9 minimal medium containing a concentration of 2,2'-dipyridyl that was higher than the MIC for that strain. Strains to be tested were cultured on LB agar, and cells were harvested with a sterile loop, and placed on the surface of the indicator-strain plates. The results were scored as positive when tester cells promoted the growth of indicator strains.

Phylogenetic tree construction. A total of 410 adenylation-domain (A-domain) sequences were retrieved from UniProt/

TrEMBL/SWISS-PROT databases (Apweiler *et al.*, 2004; Boeckmann *et al.*, 2003). These sequences were aligned with the A-domain sequences predicted for *V. anguillarum* RV22 VabE (A-domain) and VabF (A1- and A2-domains) proteins, using CLUSTAL W software (Thompson *et al.*, 1994). The resulting alignments were visually inspected, and, when appropriate, manually adjusted. The phylogenetic tree was built using the amino acid sequence that contained the A-domain substrate-binding pocket (positions 190–331) (Stachelhaus *et al.*, 1999). Phylogenetic trees relied on the modules SEQBOOT, PROTDIST, NEIGHBOR and CONSENSE of the PHYLIP package (Felsenstein, 1996). Bootstrap analysis was used to assess statistical support for relationships via branch and bound analysis of 1000 replicated datasets. The tree obtained with the initial 413-sequence multiple alignment was further used to select 56 aa sequences that grouped together with our working sequences. These were employed to construct a second phylogenetic tree, with the same methodology described above.

RESULTS AND DISCUSSION

Our previous studies have indicated that plasmidless serotype O2 strains produce a catechol siderophore whose synthesis is mediated by chromosomal genes (Conchas *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1988), in contrast with the well-known pJM1-mediated system described for *V. anguillarum* serotype O1 strain 775 (Crosa & Walsh, 2002; Stork *et al.*, 2002). Sequence analysis of an 18 kb chromosomal fragment from *V. anguillarum* strain RV22 (see Methods) revealed the presence of eight ORFs, named *dahP*, *vabA*, *vabC*, *vabE*, *vabB*, *vabS*, *vabF* and *vabH* (Fig. 1), whose deduced protein products showed significant similarity to proteins involved in siderophore-mediated iron utilization in other bacterial species (Table 3). While DahP and VabB showed 69 and 97 % identity, respectively, to partially sequenced DahP and AngB_{ch} serotype O1 chromosomally encoded homologues (Alice *et al.*, 2005), the VabA, VabC, VabE proteins showed an identity higher than 97 % to AngA_{ch}, AngC_{ch} and AngE_{ch}, respectively, which are encoded in the chromosome of *V. anguillarum* serotype O1 775 strain, and are involved in the synthesis of DHBA (Alice *et al.*, 2005) (Table 3). The same gene arrangement was observed for the RV22 and 775 homologues, and a putative Fur box predicted within the *vabA*–*vabC* intergenic region was found to be 100 % identical to that reported between *angA_{ch}* and *angC_{ch}* (Fig. 1). The three remaining genes of this cluster, *vabS*, *vabF* and *vabH*, are transcribed in the same DNA strand as *vabB* (with a putative Fur box identified upstream of *vabH*); homologues of these genes have not been described to date in *V. anguillarum* (Table 3), and they are analysed in detail below.

***vabABC* are involved in DHBA synthesis in *V. anguillarum* RV22**

To test the role of these genes in DHBA and vanchrobactin production, individual in-frame deletions of *vabABC* were constructed. When the mutants were cultured in iron-sufficient conditions (CM9 plus 10 µM ferric sulfate), no significant differences in growth levels were observed with respect to the parental strain RV22. However, under iron-restricted conditions (CM9 plus 5 µM EDDA),

MB12(Δ*vabA*), MB11(Δ*vabB*) and MB10(Δ*vabC*) mutants were severely affected in their ability to grow, in comparison with the parental strain (Fig. 2a).

These cultures were also analysed by the CAS assay to detect the production of siderophores in supernatants. The supernatants from the three null mutants cultured under iron-restricted conditions showed that no significant siderophore levels were produced, with the absorbance in the CAS assay being between 5- and 10-fold lower than in the parental strain (Fig. 2b). In addition, analysis of the supernatants by the Arnow test revealed that DHBA production was completely abolished in MB12 and MB11 mutants, and reduced about sixfold in the MB10 mutant (Fig. 2b). The cross-feeding assays showed that *V. anguillarum* RV22 wild-type and *S. enterica* *enb-1*, but not *enb-7*, promoted the growth of the *vabC* mutant (Table 4). Similarly, supernatants of the *vabC* mutant failed to complement *enb-7*. Together, these results indicate that *vabA*, *vabB* and *vabC* are most probably involved in the synthesis of DHBA in *V. anguillarum* RV22, and that they appear to be necessary for siderophore production, and growth under iron-limited conditions.

Although the *vabC*-null mutant produced residual amounts of DHBA, it has been reported that MenF, which is involved in the biosynthesis of menaquinones, synthesizes isochorismate, resulting in the production of low amounts of enterobactin in an *E. coli* *entC* mutant (Buss *et al.*, 2001). An analogous situation was reported for *V. anguillarum* serotype O1, when an *angC* mutant was found to produce residual amounts of DHBA, but this production was abolished in an *angC*–*menF* double mutant (Alice *et al.*, 2005).

When MB10 and MB12 mutants were complemented with plasmids pMB13 (containing the *vabC* gene) and pMB14 (containing the *vabA* gene), respectively, the growth levels under iron-restricted conditions were restored to the wild-type level (Fig. 2a), indicating that *vabC* and *vabA* are essential for iron uptake. In addition, the complemented mutants showed levels of DHBA and siderophore production comparable with those observed in the parental strain (Fig. 2b), confirming that *vabC* and *vabA* are essential for DHBA and siderophore biosynthesis in strain RV22.

Characterization of *vabE* and *vabF*, and prediction of vanchrobactin components

In catechol-type siderophores, DHBA must be activated by a 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase. The remaining siderophore components are further selected and activated by non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), and assembled with DHBA to form the final siderophore molecule (Earhart, 1996; Walsh *et al.*, 1990). The RV22 VabE sequence is nearly identical to AngE_{ch}, which is encoded by the chromosome of the *V. anguillarum* O1 strain 775. AngE_{ch} is a 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase involved in the synthesis of the siderophore anguibactin, and it is responsible for the selection and activation of DHBA (Alice

Table 3. Proteins with homology to products of the *V. anguillarum* *vab* gene cluster

<i>V. anguillarum</i> protein (no. of aa, kDa)	Accession no.	Identity (%)	Similarity (%)
DAHPSynthase (305, 33.07)			
DAHPSynthase (<i>V. anguillarum</i>)	AAO92362	69	84
DAHPSynthase (<i>Vibrio vulnificus</i>)	AAO07756	58	72
DAHPSynthase (<i>E. coli</i>)	AAN79680	55	70
DAHPSynthase (<i>Shigella boydii</i>)	ZP_00697486	57	69
VabA (258, 28.32)			
AngA _{ch} (<i>V. anguillarum</i>)	AAW66007	98	98
ViuA (<i>V. vulnificus</i>)	AAO07757	60	77
VibA (<i>Vibrio cholerae</i>)	AAF93939	54	72
EntA (<i>Bacillus cereus</i>)	AAP09266	45	61
VabC (397, 43.39)			
AngC _{ch} (<i>V. anguillarum</i>)	AAW66008	98	99
AngC (<i>V. anguillarum</i>)	AAO92360	70	84
ViuC (<i>V. vulnificus</i>)	AAO07758	66	79
VibC (<i>V. cholerae</i>)	AAC45925	62	80
VabE (541, 60.31)			
AngE _{ch} (<i>V. anguillarum</i>)	AAW66009	97	98
AngE (<i>V. anguillarum</i>)	AAO92359	62	76
VibE (<i>V. cholerae</i>)	ZP_00750963	62	77
ViuE (<i>V. vulnificus</i>)	NP_937357	60	72
VabB (286, 32.73)			
AngB _{ch} (<i>V. anguillarum</i>)	AAW66010	97	98
AngB (<i>V. anguillarum</i>)	AAO92358	64	78
VibB (<i>V. cholerae</i>)	AAG00563	59	76
ViuB (<i>V. vulnificus</i>)	NP_937360	53	71
DhbB (<i>A. baumannii</i>)	AAN28931	50	67
VabS (437, 46.27)			
Probable MSF protein (<i>C. violaceum</i>)	AAQ59909	59	74
P45 (<i>A. baumannii</i>)	AAN28937	48	69
P43 (<i>E. coli</i>)	CAA40706	48	70
MSF protein (<i>S. boydii</i>)	ZP_00697587	48	70
VabF (2835, 316.52)			
CbsF (<i>C. violaceum</i>)	AAQ59905	44	60
NRPS (<i>Yersinia frederiksenii</i>)	ZP_00829712	51*	68*
Peptide synthetase (<i>B. cereus</i>)	AAP09419	27	47
EntF (<i>E. coli</i>)	AAN79148	40*	55*
NRPS (<i>Thermobifida fusca</i>)	AAZ55900	32	48
DhbF-like (<i>A. baumannii</i>)	AAN28936	42*	60*
VabH (429, 45.55)			
Enterochelin esterase (<i>Y. frederiksenii</i>)	ZP_00829710	38	54
Enterochelin esterase (<i>Y. bercovieri</i>)	ZP_00823579	38	53
Enterochelin esterase (<i>C. violaceum</i>)	NP_901901	35	54
Enterochelin esterase (<i>Y. intermedia</i>)	ZP_00833719	39	53
Fes (<i>E. coli</i>)	AAN79146	37	53
Enterochelin esterase (<i>S. enterica</i>)	NP_806023	35	52

*Identity/similarity restricted to C-terminal module.

et al., 2005). On the other hand, VabF (with a predicted size of 2835 residues) is homologous to members of the NRPS family (Table 3) that are involved in the final assembly of siderophores, for instance *E. coli* EntF (Rusnak *et al.*, 1991), *Chromobacterium violaceum* CbsF, and *Acinetobacter*

baumannii Dhbf-like proteins (Dorsey *et al.*, 2003) (Table 3).

To ascertain the role of VabE and VabF in vanchrobactin synthesis in RV22, we constructed in-frame deletion mutants

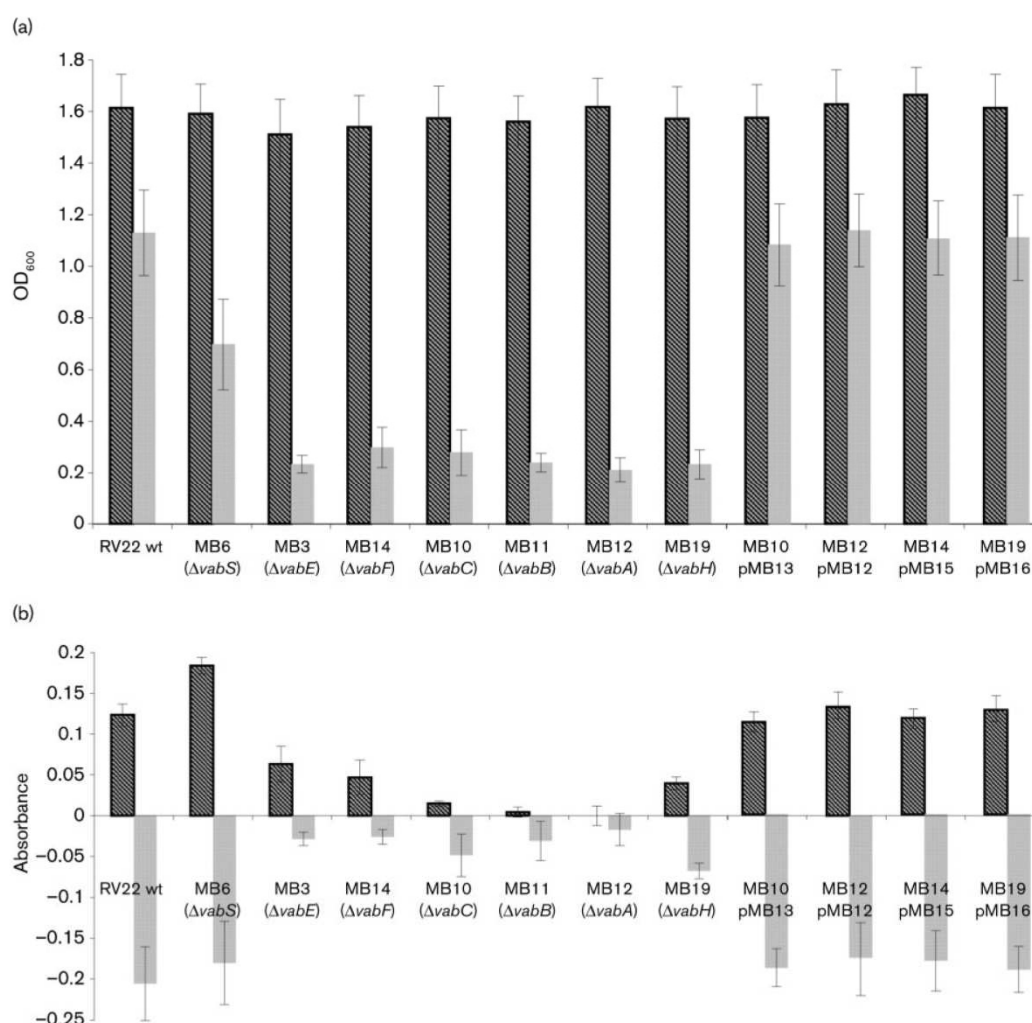


Fig. 2. (a) Growth (OD₆₀₀) after 22 h incubation of *V. anguillarum* RV22, and MB3($\Delta vabE$), MB6($\Delta vabS$), MB10($\Delta vabC$), MB11($\Delta vabB$), MB12($\Delta vabA$), MB14($\Delta vabF$) and MB19($\Delta vabH$) mutants, in CM9 minimal medium supplemented with $Fe_2(SO_4)_3$ (10 μ M; hatched bars), or the iron chelator EDDA (5 μ M; grey bars). (b) DHBA production measured by the Arnow test (A_{510}) (hatched bars), and siderophore production measured by the CAS supernatant assay (A_{630}) (grey bars). In the CAS assay, lower values indicate higher siderophore production. Results are expressed as mean values (\pm SD) from three independent experiments.

of *vabE* and *vabF*. As shown in Fig. 2a, both mutants were significantly impaired for growth under iron-limited conditions, and siderophore levels in supernatants were less than 20 % of those detected in the parental strain, indicating that these mutations result in a severe reduction of siderophore synthesis (Fig. 2b). These results are comparable with those obtained for *vabA*, *vabB* and *vabC* mutants. However, analysis of the supernatants using the Arnow test showed a significant production of DHBA (about 50 % of that produced by the wild-type) in *vabE*- and *vabF*-null mutants

(Fig. 2b). DHBA production in *vabE* and *vabF* mutants was verified in cross-feeding bioassays using the enterobactin-deficient *S. enterica enb-7* as the indicator strain. Results showed that both *vabE* and *vabF* mutants could promote the growth of *enb-7*, but not *enb-1*, indicating that *vabE* and *vabF* mutants produce DHBA, but are unable to synthesize vanchrobactin (Table 4). Complementation of *vabF* mutation with the parental *vabF* gene, provided *in trans* (plasmid pMB15), restored the wild-type phenotype in growth ability and siderophore production (Fig. 2a, b).

Table 4. Results of cross-feeding experiments with various indicator strains

Strain	Ability to cross-feed		
	MB10 ($\Delta vabC$)	<i>enb-1</i>	<i>enb-7</i>
RV22	+	+	+
<i>enb-1</i>	+	NA	+
<i>enb-7</i>	—	—	NA
MB10 ($\Delta vabC$)	NA	—	—
MB3 ($\Delta vabE$)	+	—	+
MB14 ($\Delta vabF$)	+	—	+

NA, Not applicable.

These results are in agreement with the hypothesis that VabE and VabF are two NRPSs involved in the final steps of vanchrobactin assembly. Since these steps are subsequent to the production of DHBA, this molecule would be produced normally in *vabE* and *vabF* mutants, but it could not be used for the synthesis of vanchrobactin.

Since VabE and VabF are homologous to well-described NRPSs involved in siderophore biosynthesis, and these enzymes exhibit a modular organization (Crosa & Walsh, 2002), we subjected the amino acid sequences of VabE and VabF to a domain-prediction analysis. Results indicated that VabE contains a unique A-domain, and that VabB consists of a single aryl-carrier-protein (ArCP) domain. Therefore, VabE and VabB could constitute an initiation module with the A-ArCP structure. VabF shows a seven-domain structure, organized into two modules: the N-terminal module (VabF module 1) follows the C-A-PCP (condensation-adenylation-peptidyl-carrier-protein) domain structure, whereas the C-terminal module (VabF module 2) contains a C-A-PCP-TE (condensation-adenylation-peptidyl-carrier-protein-thioesterase) domain structure. In addition, we were able to locate the conserved core motifs of the catalytic domains (Marahiel *et al.*, 1997) in each of the VabE, VabB and VabF predicted domains (data not shown).

In order to elucidate VabE and VabF substrate specificity, we applied the non-ribosomal code (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999). A sequence alignment of the predicted adenylation domains of VabE and VabF with the well-characterized adenylation domain of the *Bacillus subtilis* gramicidin synthetase A (GrsA) was carried out to locate the 10 residue positions that are crucial for substrate binding. Results of this analysis suggest that either DHBA or salicylate, and serine, are activated by VabE and VabF, respectively. However, it seems clear that DHBA should be the actual substrate activated by the initiation module (VabE-VabB), not only because the closest VabE homologues are 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligases (Table 3), but also because vanchrobactin is a catechol-type siderophore (Lemos *et al.*, 1988; Soengas *et al.*, 2006).

Since the sequence alignments were not sufficient to establish VabF substrate-specificity prediction, we constructed a neighbour-joining tree from a multiple sequence alignment of A-domain substrate-binding pocket sequences for substrate determination (Di Vincenzo *et al.*, 2005). The results confirmed our previous specificity predictions for VabE and VabF. The VabE A1-domain was clustered with a bootstrap value of 66 % into a branch containing DHBA and salicylate-specific A-domains (Fig. 3). This cluster could be further divided in two subgroups: one including some well-characterized proteins with DHBA-AMP ligase activity, such as *E. coli* EntE or *Vibrio cholerae* VibE; and a second subgroup including proteins with salicyl-AMP ligase activity. The VabE A-domain was clustered with a bootstrap value of 68 % into the subgroup of 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligases. Interestingly, the VabF A1-domain clustered together with a bootstrap value of 95 % into the branch that grouped A-domains responsible for the selection and adenylation of amino acids with a positively charged side chain. The VabF A2-domain clustered, with a bootstrap value of 96 %, with serine-specific A-domains, such as those of the *E. coli* and *Shigella sonnei* EntF proteins, and the A-1 and A-2 domains of *Pseudomonas syringae* SyrE (Fig. 3).

According to these analyses, vanchrobactin should be composed of at least the following residues: (i) DHBA; (ii) serine; and (iii) an amino acid from the group ornithine/lysine/arginine, since these amino acids belong to the same specificity-pocket family (Rausch *et al.*, 2005). The recent elucidation of vanchrobactin chemical structure (Soengas *et al.*, 2006) showed that this siderophore is a N-[N'-(2,3-dihydroxybenzoyl)-arginy]-serine (Fig. 4c). Thus, the structural chemical data are in complete agreement with the component prediction based on the amino acid sequences of VabE and VabF. These data, together with the mutagenesis analysis described above, strongly suggest that VabE and VabF are the key enzymes involved in vanchrobactin biosynthesis.

VabS as a putative siderophore exporter

VabS is a predicted protein of 437 aa that shows homology to the 12-transmembrane-segment members of the major facilitator superfamily (MFS) class of proton-motive-force-dependent membrane efflux pumps (Paulsen *et al.*, 1996), such as the *E. coli* EntS (P43), a protein encoded within the *ent* operon that participates in the secretion of enterobactin (Furrer *et al.*, 2002). The VabS protein shares conserved domains with members of the MFS family, especially the amino acid motifs that define it (Pao *et al.*, 1998).

The prediction of transmembrane structure of *V. anguillarum* VabS using the TMHMM program showed the characteristic 12-transmembrane segments, equivalent to those described for the *E. coli* enterobactin siderophore exporter P43 (EntS) (Furrer *et al.*, 2002), with the exception of transmembrane domain 11. An analogous situation was reported for the *A. baumannii* P45 protein (Dorsey *et al.*, 2003).

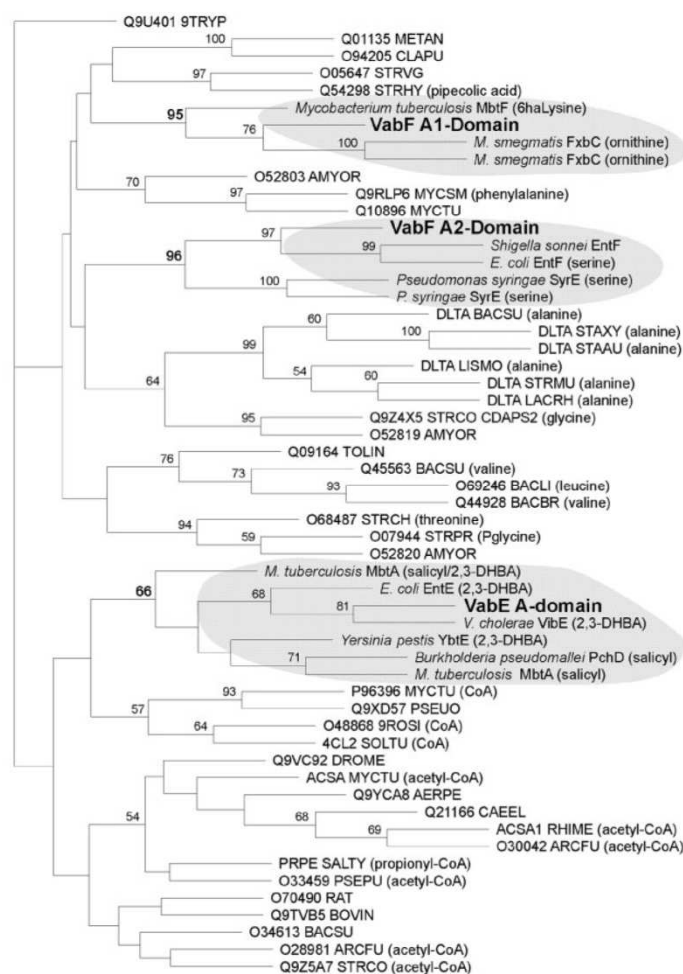


Fig. 3. Neighbour-joining tree of 56 adenylation domains based on the alignment of the substrate-binding pockets. Proteins are named according to their SWISS-PROT entry names (<http://www.ebi.uniprot.org>). The relevant closest homologues to *V. anguillarum* VabF A1- and A2-domains, and VabE A-domain, are also denoted, with species name and protein nomenclature. Substrate specificity is shown in parentheses.

In order to gain an insight into the role of *vabS* in vanchrobactin-mediated iron acquisition, we constructed a deletion mutant. The *vabS* mutant showed a reduction in its growth ability under iron-limited conditions (Fig. 2a). Interestingly, when the Arnow assay was carried out with *vabS* mutant supernatants, not only did it yield values similar to the RV22 wild-type during the first hours of culture (data not shown), but these values showed an increase of 50 % after 22 h, with respect to the wild-type (Fig. 2b). However, the levels of siderophore production in the *vabS* mutant, as determined by the CAS assay, did not show significant differences with respect to the wild-type (Fig. 2b). In this regard, it has been reported that the *E. coli* P43 mutant is unable to secrete enterobactin efficiently, its growth ability being supported by 2,3-dihydroxybenzoyl-serine (DBS), an enterobactin breakdown product that retains iron-chelating activity, and freely diffuses out of the cells (Furrer *et al.*, 2002; Hantke, 1990; Rabsch *et al.*, 2003). Something similar could

occur in *V. anguillarum* RV22, and a precursor or breakdown product of vanchrobactin could also act as a siderophore. These products could be detected by Arnow and CAS assays, although their efficiency in supplying iron to the cell would be inferior to the natural siderophore, and would probably result in lower growth levels (Fig. 2a). If the cells have not taken up enough iron, this would produce an increase in DHBA and/or other vanchrobactin precursors (Fig. 2b). These results, together with the comparative analysis of the protein sequence, suggest that VabS could be involved in the export of vanchrobactin.

***vabH* encodes a putative siderophore-degrading enzyme**

In most bacteria, once a ferric-siderophore complex enters the cytoplasm, iron is removed by a mechanism requiring an esterase activity. To test the potential role of VabH in

M. Balado, C. R. Osorio and M. L. Lemos

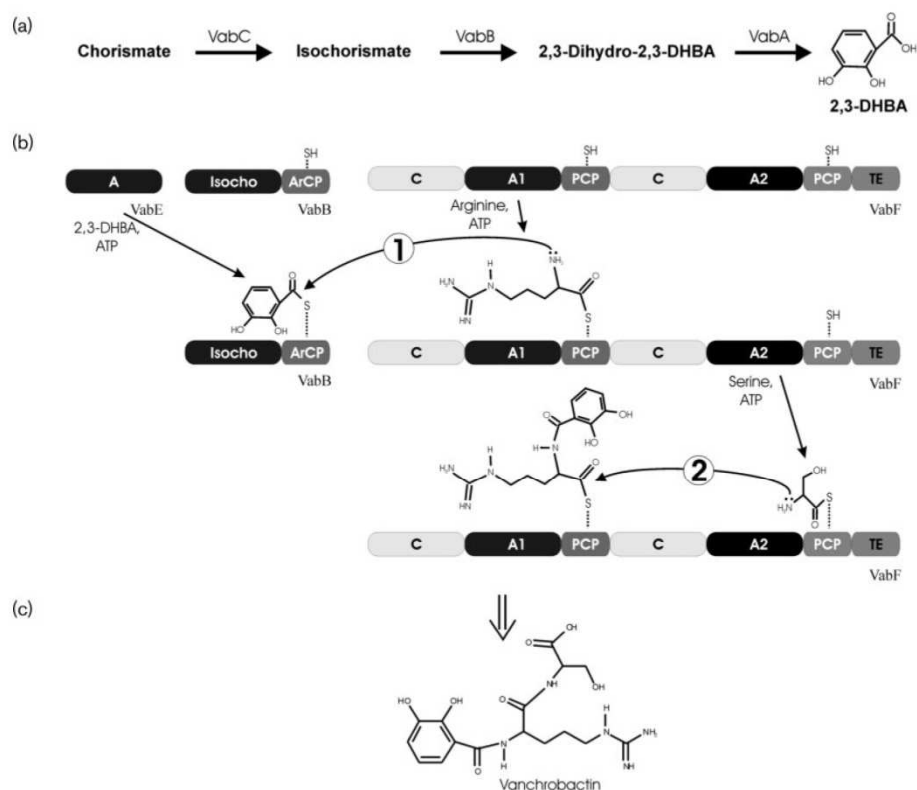


Fig. 4. Proposed model for vanchrobactin biosynthesis pathway. (a) Intermediates and enzymes involved in the DHBA biosynthesis. (b) Proposed model for vanchrobactin assembly, based on enterobactin and anguibactin biosynthesis machinery (Crosa & Walsh, 2002), and according to the domain specificity/arrangement of the NRPS VabE–VabB and VabF proteins determined in this work, and vanchrobactin chemical structure (c).

siderophore utilization, we constructed an in-frame deletion mutant of the *vabH* gene. As shown in Fig. 2a, the MB19($\Delta vabH$) null mutant was impaired for growth under iron-limited conditions, although both the CAS assay and the Arnow test showed a significant production of siderophore and DHBA, respectively (Fig. 2b). This could be evidence of the inability of the *vabH* mutant to utilize intracellular ferric–vanchrobactin. When the MB19 mutant strain was transformed with the pMB16 plasmid containing the *vabH* gene, the growth ability under iron-limited conditions was restored to wild-type levels. In addition, DHBA production and siderophore production in the complemented mutant gave values that were similar to those obtained with the parental strain (Fig. 2a).

In *E. coli*, the internalized ferric–enterobactin complex is degraded to ferrous iron (Fe^{2+}) and the linear trimer, dimer and monomer of DBS by means of a ferric–enterobactin esterase (Fes) (Brickman & McIntosh, 1992; Furrer *et al.*, 2002). The predicted translation product of *vabH* is a protein of 401 aa, with 53 % similarity to Fes (Table 3),

suggesting that this gene could be the *E. coli* fes orthologue. However, other Fes homologues do not play a role in iron release from the ferric–siderophore, but they do play a role in the degradation of the siderophore. This is the case for CbsH, a Fes homologue with a peptidase activity involved in degradation of chrysobactin, which is a siderophore produced by *Erwinia chrysanthemi* that has a structure closely similar to vanchrobactin (Rauscher *et al.*, 2002). Thus, although more work is needed to unravel the precise role of this gene in vanchrobactin utilization, *V. anguillarum* VabH could play a potential role in degrading vanchrobactin after its internalization.

A biosynthetic model for vanchrobactin

From the genetic data reported here, as well as the chemical structure and previous reports for enterobactin and anguibactin synthesis (Crosa & Walsh, 2002), we propose the model for the biosynthesis of vanchrobactin shown in Fig. 4.

DAHP synthase is not one of the enzymes directly connected to siderophore synthesis, but catechol-type siderophore biosynthesis itself starts with the conversion of chorismate into the DHBA, and DAHP is an intermediate in chorismate synthesis (Kloosterman *et al.*, 2003). According to the role assigned to the *E. coli* homologues (Earhart, 1996; Walsh *et al.*, 1990), the enzymes involved in DHBA biosynthesis from chorismate in *V. anguillarum* RV22 should be an isochorismate synthase (VabC), an isochorismatase (VabB), and a 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase (VabA) (Fig. 4a).

Once DHBA is synthesized, 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase activity is necessary for DHBA activation (Crosa & Walsh, 2002). The protein encoded by *vabE* is the candidate for activating DHBA to its acyl-adenylate derivative in an ATP-dependent manner, and for transferring this activated species to holo-VabB. According to enterobactin and anguibactin synthesis models (Ehmann *et al.*, 2000), VabB could be involved in DHBA biosynthesis through its isochorismatase activity, and in further binding of DHBA through its ACP domain.

The adenylation domains of NRPS are responsible for the selection and incorporation of either one amino acid or one carboxy acid into the final product (Crosa & Walsh, 2002). According to the sequence analysis and chemical data mentioned above, the VabF A1-domain should activate an arginine residue, and, through its PCP domain, the 2,3-dihydroxybenzoyl-arginine precursor should be synthesized. The VabF A2-domain should then activate a serine residue, since this is the substrate predicted by the non-ribosomal code, and on the basis of the high homology showed by the VabF A2-domain and *E. coli* EntF (Fig. 3), which is a well-characterized ATP-dependent serine-activating enzyme (Reichert *et al.*, 1992). The TE domain is the last domain to play a role in the biosynthesis of a non-ribosomal peptide, releasing the final product (Lautru & Challis, 2004). The TE domain predicted in the VabF module 2 would have this role, releasing vanchrobactin into solution.

In conclusion, from the results described here and those reported by others (Alice *et al.*, 2005), it seems reasonable to speculate that the vanchrobactin biosynthesis cluster, or at least part of it, is shared by serotypes O1 and O2 of *V. anguillarum*, and that vanchrobactin is probably the functional siderophore in strains lacking the pJM1-type plasmid. A study of the distribution of the genes described here is required for other strains in order to clarify the evolution of plasmid- and chromosomal-mediated siderophore biosynthesis in *V. anguillarum*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Professor J. H. Crosa (OHSU, USA) for many helpful discussions. This work was supported by grants AGL2003-00086 and AGL2006-00697 from the Ministry of Education and Science of Spain (cofunded by the FEDER Programme from the European Union), and

grants PGIDIT04PXIC23501PN and PGIDIT04RMA261014PR-3 from Xunta de Galicia to M. L. L. M. B. is the recipient of an FPI fellowship from the Ministry of Education and Science of Spain.

REFERENCES

- Alice, A. F., Lopez, C. S. & Crosa, J. H. (2005). Plasmid- and chromosome-encoded redundant and specific functions are involved in biosynthesis of the siderophore anguibactin in *Vibrio anguillarum* 775: a case of chance and necessity? *J Bacteriol* **187**, 2209–2214.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H. & 12 other authors (2004). UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **32**, D115–119.
- Arnou, L. E. (1937). Colorimetric determination of the components of 3,4 dihydroxyphenyl-alanine-tyrosine mixtures. *J Biol Chem* **118**, 531–537.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R. & 10 other authors (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**, D138–141.
- Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R. & 9 other authors (2003). The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* **31**, 365–370.
- Brickman, T. J. & McIntosh, M. A. (1992). Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J Biol Chem* **267**, 12350–12355.
- Buss, K., Muller, R., Dahm, C., Gaitatzis, N., Skrzypczak-Pietraszek, E., Lohmann, S., Gassen, M. & Leistner, E. (2001). Clustering of isochorismate synthase genes *menF* and *entC* and channeling of isochorismate in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1522**, 151–157.
- Challis, G. L., Ravel, J. & Townsend, C. A. (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* **7**, 211–224.
- Chen, Q., Actis, L. A., Tolmasky, M. E. & Crosa, J. H. (1994). Chromosome-mediated 2,3-dihydroxybenzoic acid is a precursor in the biosynthesis of the plasmid-mediated siderophore anguibactin in *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **176**, 4226–4234.
- Conchas, R. F., Lemos, M. L., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1991). Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2956–2962.
- Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 223–249.
- Di Vincenzo, L., Grgurina, I. & Pascarella, S. (2005). *In silico* analysis of the adenylation domains of the freestanding enzymes belonging to the eucaryotic nonribosomal peptide synthetase-like family. *FEBS J* **272**, 929–941.
- Dorsey, C. W., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H. & Actis, L. A. (2003). Genetic organization of an *Acinetobacter baumannii* chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport. *Microbiology* **149**, 1227–1238.
- Earhart, C. F. (1996). Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn, pp. 1075–1090. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Ehmann, D. E., Shaw-Reid, C. A., Losey, H. C. & Walsh, C. T. (2000). The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP

- transfers to thiolation domain cosubstrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2509–2514.
- Felsenstein, J. (1996). Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. *Methods Enzymol* **266**, 418–427.
- Furrer, J. L., Sanders, D. N., Hook-Barnard, I. G. & McIntosh, M. A. (2002). Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol Microbiol* **44**, 1225–1234.
- Hall, T. A. (1999). BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- Hantke, K. (1990). Dihydroxybenzoylserine – a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* **55**, 5–8.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**, 6557–6567.
- Holmstrom, K. & Gram, L. (2003). Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to the potential fish probiont *Pseudomonas fluorescens* AH2, using RNA-arbitrarily primed PCR. *J Bacteriol* **185**, 831–842.
- Kloosterman, H., Hessels, G. I., Vrijbloed, J. W., Euverink, G. J. & Dijkhuizen, L. (2003). (De)regulation of key enzyme steps in the shikimate pathway and phenylalanine-specific pathway of the actinomycete *Amicycolatopsis methanolica*. *Microbiology* **149**, 3321–3330.
- Lautru, S. & Challis, G. L. (2004). Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* **150**, 1629–1636.
- Lemos, M. L., Salinas, P., Toranzo, A. E., Barja, J. L. & Crosa, J. H. (1988). Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **170**, 1920–1925.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* **97**, 2651–2674.
- Mouriño, S., Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2004). Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **186**, 6159–6167.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1–34.
- Parales, R. E. & Harwood, C. S. (1993). Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram[−] bacteria. *Gene* **133**, 23–30.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H. & Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60**, 575–608.
- Pedersen, K., Grisez, L., van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F. & Larsen, J. L. (1999). Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Curr Microbiol* **38**, 183–189.
- Pollack, J. R., Ames, B. N. & Neilands, J. B. (1970). Iron transport in *Salmonella typhimurium*: mutants blocked in the biosynthesis of enterobactin. *J Bacteriol* **104**, 635–639.
- Rabsch, W., Methner, U., Voigt, W., Tschape, H., Reissbrodt, R. & Williams, P. H. (2003). Role of receptor proteins for enterobactin and 2,3-dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **71**, 6953–6961.
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W. & Huson, D. H. (2005). Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res* **33**, 5799–5808.
- Rauscher, L., Expert, D., Matzanke, B. F. & Trautwein, A. X. (2002). Chrysobactin-dependent iron acquisition in *Erwinia chrysanthemi*. Functional study of a homolog of the *Escherichia coli* ferric enterobactin esterase. *J Biol Chem* **277**, 2385–2395.
- Reichert, J., Sakaitani, M. & Walsh, C. T. (1992). Characterization of EntF as a serine-activating enzyme. *Protein Sci* **1**, 549–556.
- Rusnak, F., Sakaitani, M., Drueckhammer, D., Reichert, J. & Walsh, C. T. (1991). Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the *entF* gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry* **30**, 2916–2927.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47–56.
- Soengas, R. G., Anta, C., Espada, A., Paz, V., Ares, I. R., Balado, M., Rodríguez, J., Lemos, M. L. & Jiménez, C. (2006). Structural characterization of vancrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Tetrahedron Lett* **47**, 7113–7116.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**, 493–505.
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T. J., Crosa, L. M. & Crosa, J. H. (2002). Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* **48**, 222–228.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Toranzo, A. E. & Barja, J. L. (1990). A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis Aquat Org* **9**, 73–82.
- Toranzo, A. E., Santos, Y. & Barja, J. L. (1997). Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. *Dev Biol Stand* **90**, 93–105.
- Tusnady, G. E. & Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**, 849–850.
- Walsh, C. T., Liu, J., Rusnak, F. & Sakaitani, M. (1990). Molecular studies on enzymes in chorismate metabolism and enterobactin biosynthetic pathway. *Chem Rev* **90**, 1105–1129.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**, 611–647.
- Wang, R. F. & Kushner, S. R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**, 195–199.
- Wolf, M. K. & Crosa, J. H. (1986). Evidence for the role of a siderophore in promoting *Vibrio anguillarum* infections. *J Gen Microbiol* **132**, 2949–2952.

Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*

Miguel Balado, Carlos R. Osorio and Manuel L. Lemos

Correspondence
Manuel L. Lemos
mlemos@usc.es

Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Aquaculture and Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, Campus Sur, Santiago de Compostela 15782, Spain

Some *Vibrio anguillarum* strains produce a catechol-type siderophore named vanchrobactin, whose biosynthetic pathway has not been completely elucidated. In addition to the previously described genes *vabA*, *vabC*, *vabB*, *vabE*, *vabF*, *vabS* and *vabH*, in the present study we have identified the genes encoding a DAHP (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate) synthetase (*vabG*), a phosphopantetheinyl transferase (*vabD*), a LysR-family transcriptional regulator (*vabR*) and a putative siderophore receptor (*fvfA*). A deletion affecting *vabG* or *vabD* greatly reduced growth under iron-limiting conditions, whereas deletion of *vabR* did not have significant effects. Vanchrobactin production was abolished in the *vabD* mutant, whereas the *vabG* mutant retained a residual vanchrobactin production ability. Reverse transcriptase-mediated PCR indicated that this 11-gene cluster is organized into six iron-regulated transcriptional units. Transcriptional *lacZ* fusions demonstrated that the ferric uptake regulator (Fur) protein is the main iron-responsive regulator of these genes. Interestingly, the *vabG* gene was strongly iron-repressed, but Fur was not essential for this repression. In addition, the maximal expression from the *vabG* promoter was achieved only in the presence of an intact copy of *vabR*. Analysis of the β -galactosidase activities of a *fvfA::lacZ* fusion in a *vabB* mutant and in the presence of added vanchrobactin suggested that a ferric-vanchrobactin-dependent activator plays a positive regulatory role in transcription of the *fvfA-vabD* operon. This possibility is reinforced by the presence of a predicted AraC box upstream of *fvfA*. We propose that vanchrobactin biosynthesis is subjected to a complex regulatory circuitry aimed at adjusting vanchrobactin production for the maintenance of iron homeostasis in *V. anguillarum*.

Received 9 January 2008
Revised 8 February 2008
Accepted 11 February 2008

INTRODUCTION

Iron is an essential nutrient for most bacteria, acting as a cofactor of many enzymes with redox activity. Most of the iron in biological systems is chelated by high-affinity iron-binding proteins, and thus bacterial pathogens have developed efficient mechanisms to obtain iron from host tissues (Ratledge & Dover, 2000). One of the main strategies is the synthesis of siderophores, high-affinity iron chelators that are released into the extracellular environment, where they complex iron and deliver it to the bacterial cell (Crosa, 1989; Wandersman & Delepelaire,

2004). Many siderophores are small peptides synthesized by non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), which are multimodular enzymes that produce a peptide without an RNA template (Crosa & Walsh, 2002; Schwarzer *et al.*, 2003). Other bacterial siderophores of non-polypeptidic nature are synthesized via NRPS-independent pathways (Challis, 2005).

Vibrio anguillarum is the causative agent of vibriosis, a generally fatal haemorrhagic septicaemic disease in a variety of marine animals (Toranzo & Barja, 1990). It is known that siderophore-mediated iron-acquisition systems play an important role in the pathogenicity of *V. anguillarum* for fish (Di Lorenzo *et al.*, 2003; Wolf & Crosa, 1986). Currently, two clearly different siderophore-mediated systems are known in *V. anguillarum*. Strains that harbour the 65 kb pJM1 or pJM1-like plasmids produce the siderophore anguibactin (Stork *et al.*, 2002), although its synthesis also requires chromosomal genes (Alice *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 1994). Strains that lack pJM1-like plasmids produce a different catecholate siderophore (Conchas *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1988), named vanchro-

Abbreviations: DAHP, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; DHBA, 2,3-dihydroxybenzoic acid; EDDA, ethylenediamine-di-(*o*-hydroxyphenyl acetic acid); Fur, ferric uptake regulator; FURTA, Fur titration assay; LTTR, LysR-type transcriptional regulator; NRPS, non-ribosomal peptide synthetase; PPTase, phosphopantetheinyl transferase.

The GenBank/EMBL/DDJB accession number for the sequence of *V. anguillarum* is AM168450.

A supplementary table showing the oligonucleotides used in this study is available with the online version of this paper.

bactin. Vancrobactin is assembled from the precursors 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), serine and arginine (Soengas *et al.*, 2006), following an NRPS-based mechanism encoded by chromosomal genes (Fig. 1). VabE, VabB and VabF are three NRPSs that have been demonstrated to be essential for vancrobactin biosynthesis (Balado *et al.*, 2006). Phosphopantetheinyl transferases (PPTases) are required for the NRPS to be functional, since they catalyse the essential post-translational activation of carrier proteins (Crosa & Walsh, 2002). To date, no candidate PPTase genes have been described in vancrobactin-producing *V. anguillarum* strains.

DHBA, one of the vancrobactin components, is synthesized from chorismate (an aromatic amino acid intermediate). One of the steps in the biochemical pathway that leads to chorismate is catalysed by the DAHP synthase, responsible for the production of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP). This enzyme represents a key regulatory point in aromatic amino acid biosynthesis (Kloosterman *et al.*, 2003), and in a few species homologues of DAHP synthase genes have been

found linked to siderophore biosynthesis gene clusters (Di Lorenzo *et al.*, 2003; Osorio *et al.*, 2006), although no functional studies have been conducted.

The expression of genes involved in siderophore biosynthesis and uptake must be strictly regulated (Touati, 2000). The ferric uptake regulator (Fur) protein has been described as a major transcriptional regulator that represses the expression of many of the genes involved in iron acquisition (Braun *et al.*, 1998; Braun & Killmann, 1999; Escolar *et al.*, 1999). However, in some organisms, Fur can act indirectly as a positive regulator in controlling gene expression, for instance through the action of the small RNA RyhB (Masse & Gottesman, 2002). Genes involved in the biosynthesis of siderophores can also be subjected to transcriptional activation. There is increasing evidence that AraC-family activators are necessary for maximal expression of the respective siderophore biosynthetic and transport genes, and that these regulators require the cognate siderophore as a cofactor (Anderson & Armstrong, 2004; Brickman *et al.*, 2001; Fetherston *et al.*, 1996; Michel

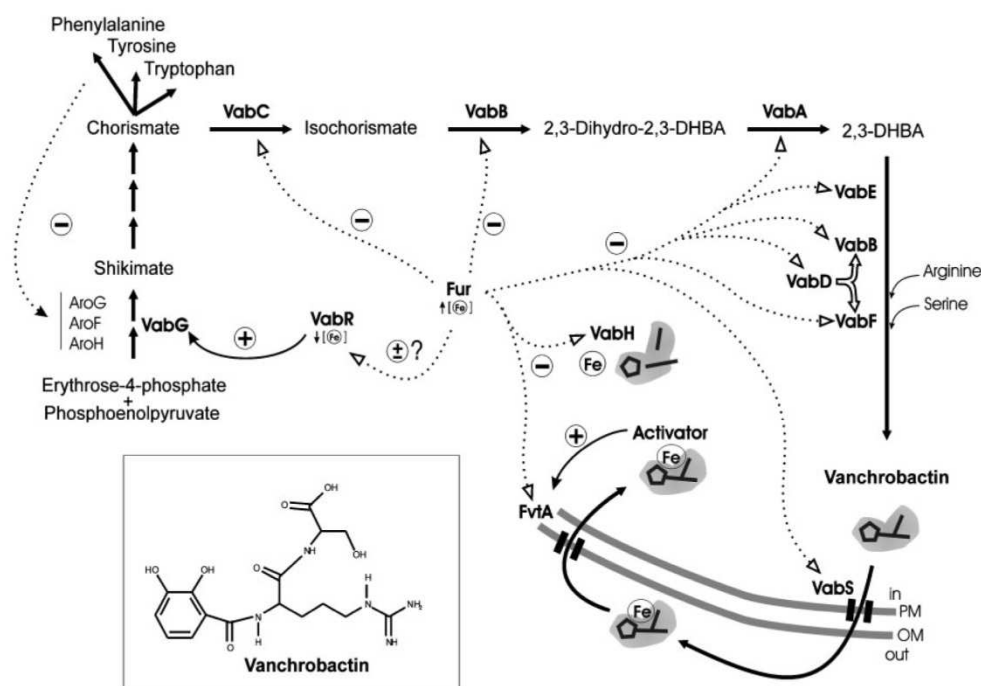


Fig. 1. A proposed scheme for vancrobactin biosynthesis and regulation. A circled plus symbol denotes activation and a circled minus symbol indicates repression. The Fur repressor protein, under conditions of high iron, represses transcription of the genes encoding VabCBAEDFHS and FvtA proteins (dashed lines ending in empty arrowheads). A dashed line ending in a filled arrowhead denotes negative regulation mediated by aromatic amino acids of genes encoding AroGFH proteins. The empty arrow arising from VabD shows the activation of the VabF peptide carrier protein (PCP) domains and VabB aryl carrier protein (ArCP) domain by VabD.

et al., 2005; Pelludat *et al.*, 1998). Similarly, LysR-type transcriptional regulators (LTTRs) activate the expression of genes involved in a wide range of cellular processes, such as amino acid biosynthesis (Panina *et al.*, 2001), virulence (Watnick *et al.*, 1998) and iron uptake (Vasil *et al.*, 1998). Most LTTRs are encoded by genes that are transcribed divergently from their target genes, and operate together with a small ligand that acts as a coinducer (Schell, 1993).

In a previous work, we characterized a cluster of seven genes involved in vanchrobactin biosynthesis and utilization, and proposed a preliminary biosynthetic model for vanchrobactin (Balado *et al.*, 2006). These genes included those responsible for the synthesis of DHBA from chorismate (*vabABC*), as well as the NRPSs involved in activation of DHBA (*vabE*), and the final assembly of DHBA, serine and arginine (*vabF*) to make vanchrobactin. Other genes putatively involved in siderophore export (*vabS*) and utilization (*vabH*) were also described as part of the cluster (Balado *et al.*, 2006). In the present study, we identified and characterized additional genetic determinants involved in the vanchrobactin biosynthetic pathway, and showed that vanchrobactin biosynthesis is subjected to a complex regulatory circuitry.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and media. The strains and plasmids used, as well as those derived from this study, are listed in Table 1. *V. anguillarum* strains were routinely grown at 25 °C in Tryptic Soy Agar and Broth (Difco) supplemented with 1% NaCl (TSA-1 and TSB-1, respectively). *Escherichia coli* strains were routinely grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) medium (Pronadisa) supplemented with the appropriate antibiotics. All strains were stored frozen at –80 °C in LB broth with 20% (v/v) glycerol. Ampicillin sodium salt and kanamycin (Sigma-Aldrich) stock solutions in ultrapure water (100 and 50 mg ml^{–1}, respectively) were filter-sterilized and stored at –20 °C.

DNA manipulations. Standard DNA manipulations were carried out as described by Sambrook & Russell (2001). Total genomic DNA from *V. anguillarum* was purified with the Easy-DNA kit (Invitrogen). Plasmid DNA purification and extraction of DNA from agarose gels were carried out using kits from Qiagen. DNA-probe labelling and Southern blot analyses were performed with the ECL DNA Labelling and Detection System (Amersham Biosciences). PCR reactions were carried out in a TGradient Thermal Cycler (Biotetra), with *Taq* polymerase (BioTaq, Boline). For inverse PCR, chromosomal DNA was digested with a single restriction enzyme, self-ligated and used as template in a PCR reaction with the Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics). The most relevant oligonucleotides used in this study are listed in Supplementary Table S1.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Resistance phenotypes: Amp^R, ampicillin; Gen^R, gentamycin; Neo^R, neomycin; Sm^R, streptomycin; Tp^R, trimethoprim.

Plasmid or strain	Relevant characteristic(s)	Reference or source
Plasmids		
pGEMT-Easy	PCR cloning vector, Amp ^R	Promega
pWKS30	Low-copy cloning vector, Amp ^R	Wang & Kushner (1991)
pT7-7	Cloning vector, Amp ^R	Tabor & Richardson (1985)
pHRP309	Low-copy-number reporter plasmid, Gen ^R	Parales & Harwood (1993)
pMB11	pHRP309 <i>ftA::lacZ</i> fusion	This study
pMB12	pHRP309 <i>vabH::lacZ</i> fusion	This study
pMB19	pHRP309 <i>vabA::lacZ</i> fusion	This study
pMB20	pHRP309 <i>vabC::lacZ</i> fusion	This study
pMB33	pHRP309 <i>vabG::lacZ</i> fusion	This study
pMB34	pHRP309 <i>vabR::lacZ</i> fusion	This study
SuperCos1	Cosmid vector, Amp ^R , Neo ^R	Stratagene
<i>V. anguillarum</i> strains		
RV22	Wild-type serotype O2 strain isolated from diseased turbot (Spain)	Lemos <i>et al.</i> (1988)
775met11	Serotype O1 strain defective in Fur protein	Tolmasky <i>et al.</i> (1994)
MB11	RV22 <i>vabB</i> defective mutant	Balado <i>et al.</i> (2006)
MB14	RV22 <i>vabF</i> defective mutant	Balado <i>et al.</i> (2006)
MB53	RV22 <i>vabR</i> defective mutant	This study
MB54	RV22 <i>vabG</i> defective mutant	This study
MB67	RV22 <i>vabD</i> defective mutant	This study
<i>E. coli</i> strains		
DH5α	SupE4 Δ <i>lacU169</i> (Φ80 <i>lacZAM15</i>) <i>hsd</i> R17 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Laboratory stock
S17-1 λpir	Tp ^R Sm ^R <i>recA, thi, pro, hsdR-M + RP4::2-Tc::Mu-Km::Tn7 λpir</i>	Herrero <i>et al.</i> (1990)
XL1-Blue MR	Δ(<i>mcrA</i>)183Δ(<i>mcrCB-hsdSmr-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i>	Stratagene
H1717	<i>araD139 rpsL150 Δ(argF-lac) relA1 U169 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR aroB fhuF::λplacMu</i>	Hantke (1987)

DNA sequencing and bioinformatics tools. DNA sequences were determined with the dideoxy chain-termination method on either plasmid or PCR products using a GenomeLab DTCS Quick Start kit with a CEQ 8000 DNA Sequencer (Beckman Coulter). Sequences were examined and assembled using BioEdit version 7.0.4.1 (Hall, 1999). The European Bioinformatics Institute (EBI) and the NCBI services were used to consult the DNA and protein sequence databases with the FASTA3 and BLAST algorithms. The protein families database of alignments and HMMs (Pfam) of the Sanger Institute was utilized to predict the protein domain organization (Bateman *et al.*, 2004). The Virtual Footprint Promoter Matches from the online database PRODORIC Release 8.1 (<http://prodoric.tu-bs.de/>) was used to identify putative regulatory operators. MFOLD (3.1.2) (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>) was used for RNA secondary structure prediction.

Construction of a *V. anguillarum* RV22 cosmid library. For construction of a cosmid library, genomic DNA from *V. anguillarum* RV22 was partially digested with the restriction enzyme *Sau3AI* and ligated into the *Bam*HI site of the SuperCos1 cosmid vector (Stratagene). Recombinant cosmids were packaged *in vitro* and transduced into *E. coli* XL1-blue MR (Stratagene). The cosmid library was screened by performing colony PCR on pools of recombinant clones using primers targeted to genes located at the 5' and 3' ends of the previously described partial vanchrobactin gene cluster (Balado *et al.*, 2006), and two cosmids, cosMB167 and cosMB69, were isolated. Cosmid DNA was purified using the QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) and used for DNA sequencing.

Construction of *vabG*, *vabD* and *vabR* deletions by allelic exchange. Gene deletions in *V. anguillarum* RV22 were constructed by allelic exchange as previously described (Mouriño *et al.*, 2004). This process led to the obtention of *V. anguillarum* MB53 ($\Delta vabR$), MB67 ($\Delta vabD$) and MB54 ($\Delta vabG$) mutant strains. Deletion of the parental gene was verified in all cases by Southern blot hybridization. DNA sequencing of the region involved in the deletion was carried out to ensure that all constructs were in-frame.

Growth under iron-limited conditions and test of siderophore production. To test the ability of *V. anguillarum* defective mutants to grow under iron-limited conditions, overnight cultures in LB of the parental and mutant strains were adjusted to OD₆₀₀ 0.5 and diluted 1:15 in CM9 minimal medium (Lemos *et al.*, 1988) containing the iron chelator ethylenediamine-di-(*o*-hydroxyphenyl) acetic acid (EDDA) at 5 μ M. Cultures were incubated at 25 °C with shaking at 150 r.p.m., and growth (OD₆₀₀) and siderophore production were measured after 22 h incubation. Siderophore production was measured using the chrome azurol-S (CAS) liquid assay (Schwyn & Neilands, 1987), which detects the presence of iron-chelating siderophore molecules. In addition, the Arnow test (Arnow, 1937), which specifically detects the presence of 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), was used for the spectrophotometric catechol measurement of each sample. A non-inoculated CM9 sample containing EDDA at appropriate concentrations was used as a negative control and as a spectrophotometric blank for the CAS liquid assay.

RNA purification and RT-PCR. *V. anguillarum* RV22 10 ml cultures were grown until exponential phase in high- and low-iron CM9 medium containing EDDA at 5 μ M or Fe₂(SO₄)₃ at 10 μ M, and total RNA was isolated with the RNA isolation reagent RNAwiz (Ambion) following the manufacturer's recommendations. RT-PCR reactions were performed with 1 μ g RNA pre-treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega) by using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). A negative control reaction for PCR was performed with total RNA without M-MLV reverse transcriptase to confirm the lack of genomic DNA contamination in each reaction mixture. All the

primers used to amplify the cDNA from putative *vabR*, *vabG*, *vabA*, *vabCE*, *vabHFSB* and *fvfAvabD* transcripts are listed in Supplementary Table S1. The operonic nature of the genes described in this study was tested by designing appropriate primers for reverse transcription located at the 3' end of the last gene for each predicted operon, and were named RT-1 to RT-6 (Fig. 2b).

Construction of *lacZ* transcriptional fusions, and β -galactosidase assays. DNA fragments corresponding to *V. anguillarum* presumptive *vabR*, *vabG*, *vabA*, *vabC*, *vabH* and *fvfA* promoter regions were obtained by PCR. The PCR-amplified putative promoter regions extended from about 300–700 bp upstream of the ATG start codon to about 50–100 bp downstream of the start codon for each tested gene. Thus, DNA fragments containing the putative promoter regions as well as additional nucleotides of the coding sequence were fused to a promoterless *lacZ* gene in the low-copy-number reporter plasmid pHRP309 (Parales & Harwood, 1993). The resulting transcriptional fusion constructs, *vabR::lacZ* (pMB34), *vabG::lacZ* (pMB33), *vabA::lacZ* (pMB19), *vabC::lacZ* (pMB20), *vabH::lacZ* (pMB12) and *fvfA::lacZ* (pMB11), were mobilized from *E. coli* S17-1 λ pir to *V. anguillarum* strains RV22 and 775met11 *fur* mutant by conjugation. The *V. anguillarum* strains carrying the promoter-*lacZ* fusion vector or control plasmid pHRP309 were grown in minimal medium CM9 under different iron-availability conditions. The β -galactosidase activities were measured by the method of Miller (1992). The data presented correspond to the mean of three independent experiments. When needed, purified vanchrobactin was obtained as previously described (Soengas *et al.*, 2006) and used at 15 ng ml⁻¹.

Fur titration assay (FURTA). The same DNA fragments used in *lacZ* transcriptional fusions, corresponding to presumptive promoter regions, were cloned in plasmid pT7-7 and transformed into the *E. coli* H1717 reporter strain (Hantke, 1987). The empty vector was used as a negative control. The colonies obtained were streaked onto MacConkey-lactose plates supplemented with 40 μ M ferric ammonium sulfate, as described elsewhere (Stojiljkovic *et al.*, 1994). The phenotype of colonies was checked after 24–48 h of incubation at 37 °C. Red colonies (Lac+) denote a FURTA-positive phenotype and indicate binding of the Fur protein to the promoter region transformed in the indicator strain (Stojiljkovic *et al.*, 1994).

Cross-feeding assays. The biological activities of the supernatants produced by parental and mutant strains were determined by cross-feeding experiments. We tested the ability of cell cultures of *V. anguillarum* siderophore-defective mutants (Table 1) to cross-feed different indicator strains that were defective in DHBA and/or siderophore synthesis. Two RV22 mutant strains that are deficient in vanchrobactin biosynthesis were used to detect vanchrobactin and DHBA production. Strain MB11 is a *VabB*-defective mutant, unable to produce DHBA (a step between chorismate and DHBA is blocked), and consequently it can use vanchrobactin and the intermediate DHBA to overcome iron limitation. The MB14 strain is blocked in the vanchrobactin assembly process (*VabF*-defective mutant), and thus it can only use vanchrobactin for iron supply, and not DHBA (Balado *et al.*, 2006).

Each indicator strain was inoculated into CM9 minimal medium containing 2,2'-dipyridyl at 80 μ M, a concentration higher than the MIC for these strains. Strains to be tested were cultured on LB agar plates supplemented with 100 μ M 2,2'-dipyridyl to induce activation of siderophore biosynthesis genes. The cells were harvested with a sterile loop and placed on top of the indicator strain plates. The results were scored as positive when tester cells promoted the growth of indicator strains. The RV22 strain was used as a positive control.

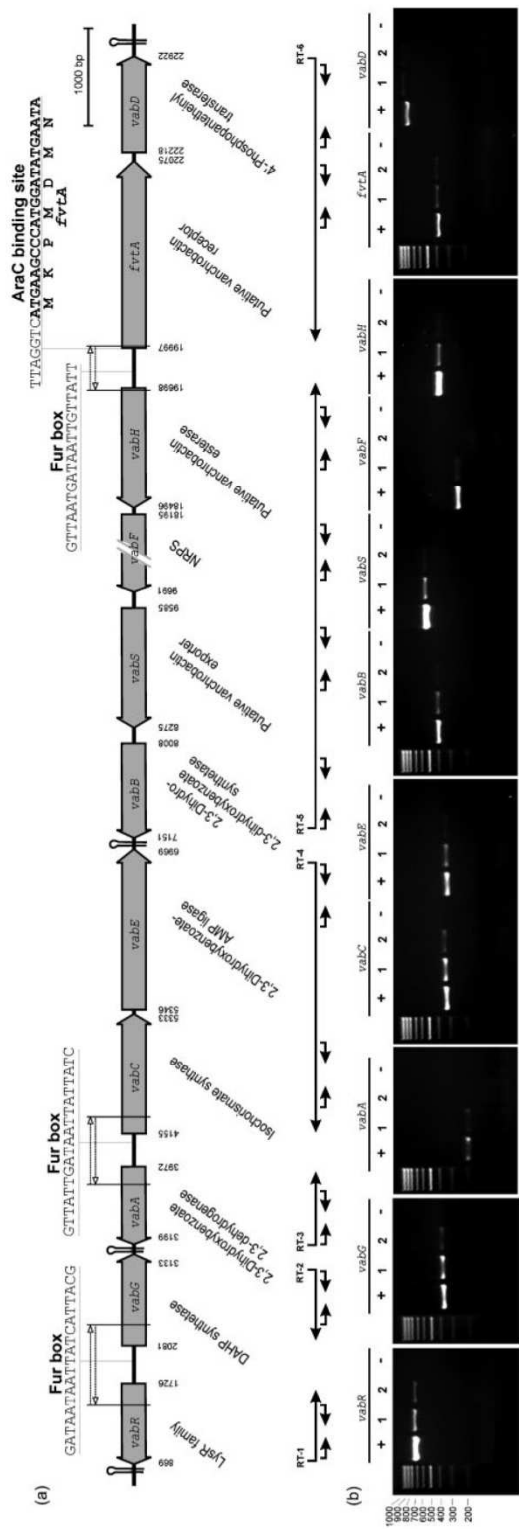


Fig. 2. (a) Physical map of the vanchrobactin biosynthesis genes of *V. anguillarum* RV22. ORFs are depicted as arrows, which indicate the direction of transcription, and the vertical numbers show the start and end points of each gene. Stem-loop structures denote putative transcriptional terminators. Dashed arrows with empty arrowheads show the regions and orientation used in transcriptional fusions. Predicted Fur boxes and a putative AraC box are shown above the ORFs. The predicted function for each gene product is shown under the ORFs. (b) Results of RT-PCR for operon mapping and for determination of iron regulation. RT denotes the binding site for primers used in reverse transcription (RT-1 to RT-6). Pairs of arrows facing each other denote the gene-specific primer pairs used in the subsequent PCR reactions. RNA for RT-PCR was purified from cells cultured under low-iron (1) and high-iron (2) conditions. Positive (+) controls are PCR reactions using chromosomal DNA as a template; negative controls (-) are PCR reactions without reverse transcriptase.

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning of new ORFs linked to vanchrobactin biosynthesis genes

In a previous work, we described seven clustered genes involved in the biosynthesis and utilization of the siderophore vanchrobactin in *V. anguillarum* RV22 and proposed a preliminary model for vanchrobactin biosynthesis (Balado *et al.*, 2006). However, some of the functions necessary to complete the vanchrobactin biosynthesis pathway remained undescribed. In the present study, we have identified additional pieces in the biosynthetic pathway, and a new vanchrobactin biosynthesis and uptake model that now includes regulatory factors is presented in Fig. 1. We constructed a cosmid library from *V. anguillarum* RV22 and isolated three overlapping cosmids that hybridized with the vanchrobactin synthesis genes previously described (Balado *et al.*, 2006). Sequencing of the novel DNA contained in these cosmids resulted in the addition to the previously reported vanchrobactin gene cluster of four novel genes: *vabR*, *vabG*, *fvtA* and *vabD* (Fig. 2a). Downstream of the previously described *vabA* gene, we found genes *vabG* and *vabR*, which are transcribed from a divergently oriented promoter. The predicted VabG protein shows high similarity to members of the *E. coli*-type DAHP synthase family (Table 2). The deduced amino acid sequence of VabR shows similarity to several members of the LysR family of transcriptional activators (Schell, 1993). At the opposite side of this cluster, we found two genes downstream of *vabH* that are transcribed from the same DNA strand. The gene *fvtA* encodes a protein that shows similarity to a series of TonB-dependent outer membrane siderophore receptors, and its location linked to the biosynthesis genes suggests that this protein might be the receptor for the ferri-vanchrobactin complex. *FvtA* shows a 31 % identity to *ViuA*, the vibriobactin receptor of *Vibrio cholerae* (Butterton *et al.*, 1992), and to *VuuA*, the

vulnibactin receptor of *Vibrio vulnificus* (Webster & Litwin, 2000). The *vabD* gene encodes a predicted PPTase (Table 2), and shows a 29 % identity to *angD*, a plasmid-harboured gene described in anguibactin-producing *V. anguillarum* strains, and which proves to encode a functional PPTase (Liu *et al.*, 2005). We further sequenced the DNA regions in the vicinity of the *vab* cluster. Downstream of *vabR* we found two ORFs encoding a putative TonB-dependent outer membrane receptor, whose closest homologues have not been functionally characterized, and a putative lipase/esterase (data not shown). Downstream of *vabD* we found an ORF encoding a predicted protein which showed similarity to the E subunit of Na⁺-translocating NADH-quinone reductases.

VabD and VabG are new pieces in the vanchrobactin biosynthesis pathway

VabD is a putative PPTase (Table 2). We constructed by allelic exchange a *vabD*-defective mutant (strain MB67) and tested its ability to produce siderophores and to grow under iron limitation. Under iron-sufficient conditions, no significant differences in growth levels were observed with respect to the parental strain RV22. However, MB67 ($\Delta vabD$) was impaired for growth under iron-restricted conditions (CM9 plus 5 μ M EDDA) (Fig. 3a). We predict that a mutation in this gene would not prevent DHBA production, while siderophore assembly should in turn be abolished. As expected, the CAS test showed no detectable levels of siderophore production in the *vabD* mutant (Fig. 3b), whereas significant levels of DHBA production were observed (Fig. 3c). These observations were further supported by the results obtained with the cross-feeding assays (Table 3). MB67 (*vabD* mutant) promoted growth of MB11 (*vabB* mutant); this may be explained by the accumulation of DHBA by MB67, which can be used by MB11 to complete vanchrobactin production. However,

Table 2. Proteins with homology to products of *V. anguillarum* genes *vabD*, *vabG* and *vabR*

<i>V. anguillarum</i> protein (no. of amino acids, molecular mass in kDa)	Accession number	Identity (%)	Similarity (%)
VabD (235, 26.96)			
EntD (<i>Marinomonas</i> sp.)	ZP_01076777	34	61
EntD (<i>Photobacterium profundum</i>)	YP_133485	34	55
VibD (<i>V. cholerae</i>)	EDN13617	34	55
EntD (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	YP_349971	35	55
VabG (351, 38.28)			
DAHP synthase (<i>Photobacterium damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>)	CAJ76915	57	73
AroG (<i>V. vulnificus</i>)	NP_762766	55	70
DAHP synthase (<i>V. anguillarum</i>)	NP_943591	69	84
AroG (<i>Vibrio angustum</i>)	ZP_01235496	52	66
VabR (286, 32.85)			
LysR (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	ZP_01260503	63	79
LysR (<i>Vibrio harveyi</i>)	EDL67341	55	74
LysR (<i>Vibrio splendidus</i>)	ZP_00988694	55	74
LysR (<i>Vibrio shilonii</i>)	ZP_01865776	48	69

M. Balado, C. R. Osorio and M. L. Lemos

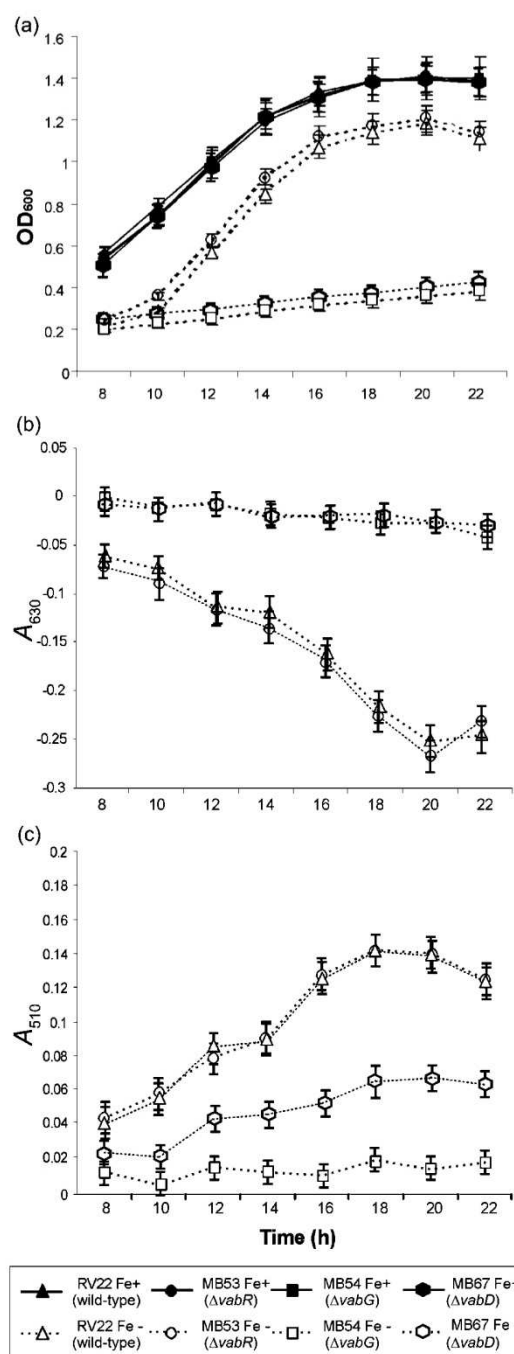


Fig. 3. (a) Growth (OD_{600}) of *V. anguillarum* RV22, MB53 ($\Delta vabR$), MB54 ($\Delta vabG$) and MB67 ($\Delta vabD$) strains in CM9 minimal medium under iron-sufficient (Fe+; 10 μ M ferric sulfate) and iron-deficient (Fe-; 5 μ M EDDA) conditions. (b) Siderophore production measured by the CAS supernatant assay (A_{630}). (c) DHBA production measured by the Arnow test (A_{510}). In the CAS assay, lower values indicate higher siderophore production. Results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments.

vanchrobactin and for the growth of *V. anguillarum* RV22 under iron limitation.

A *vabD* homologue (*angD*) has recently been described in *V. anguillarum* strains that synthesize the siderophore anguibactin, and this gene proves to encode a functional PPTase (Liu *et al.*, 2005). AngD encodes a protein that shows 29% identity to the RV22 VabD protein. Based on protein similarity data and on our studies with the *vabD* mutant, VabD is likely the PPTase involved in vanchrobactin biosynthesis, playing a role in the post-translational phosphopantetheinylation of the aryl carrier protein (ArCP) domain of VabB and the two peptide carrier protein (PCP) domains of VabF (Balado *et al.*, 2006).

Gene *vabG* encodes a putative DAHP synthase (Table 2). DAHP synthases are key enzymes in the shikimate pathway, which leads to the biosynthesis of aromatic amino acids and of numerous secondary metabolites derived from them (Hodgson, 2000), and are strictly regulated via a series of complex mechanisms (Panina *et al.*, 2001). Vanchrobactin, as a catecholate siderophore, contains DHBA in its structure (Soengas *et al.*, 2006), and this molecule is itself synthesized from chorismate via the shikimate pathway. To ascertain the role of *vabG* in vanchrobactin biosynthesis, a non-polar defective mutant was constructed by allelic exchange. When this mutant (strain MB54) was cultured in iron-sufficient conditions (CM9 plus 10 μ M ferric sulfate), no significant differences in growth levels were observed with respect to the parental strain RV22 (Fig. 3a). However, the MB54 ($\Delta vabG$) mutant was severely affected in its ability to grow under iron-restricted conditions (CM9 plus 5 μ M EDDA), and chemical tests showed that siderophore and DHBA production were significantly abolished in this mutant (Fig. 3b, c). These results demonstrate that *vabG* is essential for growth of *V. anguillarum* RV22 under iron-limiting conditions, and suggest that VabG is part of the vanchrobactin biosynthesis pathway, acting as a putative DAHP synthase. Although other DAHP synthase genes have been described linked to siderophore biosynthesis gene clusters (Osorio *et al.*, 2006), we believe that our results represent the first experimental evidence of a DAHP synthase gene whose function is necessary for optimal siderophore production.

To test whether vanchrobactin biosynthesis is either partially or completely abolished in the *vabG* mutant, we tested the ability of strain MB54 to cross-feed a series of

MB67 could not cross-feed MB14 (*vabF* mutant), which can only use vanchrobactin. These results clearly demonstrate that *vabD* is essential for the biosynthesis of

Table 3. Results of cross-feeding experiments

The tester strains are listed in the column at the left, and their ability to cross-feed the four indicator mutant strains MB54, MB67, MB11 and MB14 is scored as positive, negative, or weak positive. NA, Not applicable; (+), weak positive.

Strain	Ability to cross-feed			
	MB54 ($\Delta vabG$)	MB67 ($\Delta vabD$)	MB11 ($\Delta vabB$)	MB14 ($\Delta vabF$)
MB54 ($\Delta vabG$)	NA	(+)	(+)	(+)
MB67 ($\Delta vabD$)	+	NA	+	–
MB11 ($\Delta vabB$)	+	–	NA	–
MB14 ($\Delta vabF$)	+	–	+	NA
RV22	+	+	+	+

vanchrobactin-deficient indicator strains (Table 3). Surprisingly, we found that the MB54 mutant was able to induce low levels of growth of MB14, a *vabF* mutant that can only use vanchrobactin to overcome the iron limitation. Similarly, MB54 also cross-fed MB11 ($\Delta vabB$), which can use both vanchrobactin and DHBA (Table 3). These results indicate that, although vanchrobactin biosynthesis is significantly reduced in the *vabG* mutant, it is not completely abolished. This observation would suggest that another gene or genes in *V. anguillarum* encodes a DAHP synthase activity that can partially, but not completely, substitute for the VabG function. This being the case, one gene could encode an isoenzyme mainly involved in the production of extra chorismate molecules for siderophore biosynthesis, while keeping a paralogue involved in the production of aromatic amino acids. In *E. coli* and other Gram-negative bacteria such as *V. cholerae*, up to three paralogous DAHP synthase genes (*aroF*, *aroG* and *aroH*), involved exclusively in amino acid biosynthesis, have been described coexisting in the same genome (Panina *et al.*, 2001, 2003). The necessity of having a specific isoenzyme involved in siderophore production is motivated by the fact that the paralogues involved in aromatic amino acid production are strictly regulated at the transcriptional (Pittard *et al.*, 2005), translational (Yanofsky, 2000), and enzymic activity levels (Pittard *et al.*, 2005). The interconnection between the biosynthetic routes leading to siderophore biosynthesis and to amino acids (two routes that share chorismate as an intermediate) has been recently evidenced in a *Bacillus subtilis* transcriptome study (Miethke *et al.*, 2006). These authors found that 11 amino acid biosynthesis genes were more than 40 % upregulated during iron starvation, and all of them encoded enzymes that are essential for the synthesis of the precursors threonine, glycine and DHBA of the siderophore bacillibactin.

The vanchrobactin biosynthesis gene cluster is organized into six iron-regulated transcriptional units

The three intergenic regions *vabR–vabG*, *vabA–vabC* and *vabH–fvtA* show a structure of divergent promoters.

Moreover, two putative Rho-independent transcriptional terminators were located by *in silico* analysis between the *vabG–vabA* and *vabE–vabB* stop codons (Fig. 2a). All these observations suggest that the *V. anguillarum* vanchrobactin biosynthesis gene cluster is organized in six transcriptional units: *vabR*, *vabG*, *vabA*, *vabCE*, *vabHFSB* and *fvtAvabD*. To confirm the transcriptional association of the three putative polycistronic messages, we carried out reverse-transcription reactions using primers located at the 3' end of the last gene for each predicted operon (primers RT-1 to RT-6 in Fig. 2b), and subsequent gene-specific PCR reactions were conducted. These RT-PCR experiments were carried out using RNA purified under conditions of both iron deficiency and iron sufficiency. The results obtained in this assay (Fig. 2b) confirmed the existence of three polycistronic mRNAs, one comprising the *vabH*, *vabF*, *vabS* and *vabB* genes, the second comprising *vabC* and *vabE*, and the last *fvtA* and *vabD*. However, these results do not rule out the possibility that additional promoters exist within this cluster, and may drive independent transcription of some of the genes. In addition, the transcripts of the six predicted transcriptional units were shown to be weakly expressed under iron-rich conditions (10 μ M ferrous sulfate) (Fig. 2b), whereas the intensity of the bands was significantly increased when using RNA samples from cultures supplemented with the iron chelator EDDA (5 μ M). Although RT-PCR carried out under these conditions is not the most accurate quantitative assay for RNA levels, it provides evidence that the expression of the genes of this cluster is indeed subject to regulation by iron.

The putative promoter regions contain consensus sequences for the binding of negative and positive regulators

Examination of the intergenic sequences of this cluster revealed three conserved Fur binding sites (Fig. 2a). The intergenic region *vabR–vabG* harbours a putative Fur box (GATAATAATTATCATTACG) with an identity of 15 out of 19 positions to the *E. coli* consensus iron box (de Lorenzo *et al.*, 1987) (the positions identical to the consensus are underlined). Two similar sequences,

M. Balado, C. R. Osorio and M. L. Lemos

GTAAATGATAATTGTTATT and GTTATTGATAAT-TATTATC, were found in the intergenic regions *vabH*-*fvtA* and *vabA*-*vabC* (Fig. 2a). The presence of these Fur binding sites would suggest that the Fur repressor exerts iron-dependent regulation of vanchrobactin synthesis genes. In order to gain further evidence that these promoters contain sequences for the binding of Fur, FURTA was carried out as described elsewhere (Stojiljkovic *et al.*, 1994) by cloning the presumptive promoter sequences containing potential Fur boxes into the FURTA indicator strain H1717 (Hantke, 1987). As a result, all the cloned promoters showed a typical FURTA-positive phenotype (evidenced as Lac⁺ colonies on MacConkey agar plates supplemented with excess iron), which suggests that the cloned sequences harbour sites for binding of the *E. coli* Fur protein.

In addition to the Fur-mediated repression, transcriptional regulators with a positive action have been described as playing roles in gene regulation (Chen & Crosa, 1996; Gallegos *et al.*, 1997). We therefore subjected the promoter sequences of this cluster to the PRODORIC database using the Virtual Footprint promoter analysis software, and as a result we predicted a putative AraC-type regulator binding site (TATTCATATCCATGGGCTTCATGACCTAA) in the negative strand of the *fvtA* gene, which includes the *fvtA* start codon (Fig. 2a).

Transcriptional *lacZ* fusions demonstrate that expression of vanchrobactin synthesis genes is iron regulated

To define the promoter activities and test whether the iron-mediated regulation of the vanchrobactin biosynthesis gene cluster occurred at the transcriptional level, as suggested by

the RT-PCR results (Fig. 2b), we constructed transcriptional fusions and examined their expression under high- and low-iron conditions. As a control, *V. anguillarum* RV22 carrying the pHRP309 plasmid without any promoter was analysed in parallel, exhibiting almost undetectable levels of β -galactosidase activity under all the growth conditions tested (data not shown). When the constructions were assayed in *V. anguillarum* RV22, high β -galactosidase activities were observed for *vabR*::*lacZ*, *vabG*::*lacZ*, *vabH*::*lacZ*, *fvtA*::*lacZ*, *vabC*::*lacZ* and *vabA*::*lacZ* fusions in low-iron medium (CM9 plus EDDA at 5 μ M), whereas the addition of 10 μ M $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ to the culture medium resulted in the lowest β -galactosidase activity, indicating repression of promoter activity (Fig. 4). All the fusions with the exception of *vabR*::*lacZ* showed a reduction of ~90 % in their expression patterns under high-iron conditions with respect to levels shown under low-iron conditions (Fig. 4). In the case of the *vabR*::*lacZ* construction, this reduction was about 50 %. The transcriptional repression observed under iron-replete conditions is consistent with a predicted role for Fur in regulation. To demonstrate that the observed repression is indeed Fur-mediated, the fusions were conjugated into the *V. anguillarum fur* mutant strain 775met11 (Tolmasky *et al.*, 1994). The same iron conditions utilized for RV22 were now assayed with 775met11, and results are summarized in Fig. 4. Iron-dependent repression of promoters was not detected when the *vabH*::*lacZ*, *fvtA*::*lacZ*, *vabC*::*lacZ* and *vabA*::*lacZ* fusions were assayed in the *fur* mutant, and the β -galactosidase activities were high under both high- and low-iron conditions, indicating that these promoters are constitutive in the absence of Fur.

Surprisingly, the *vabG*::*lacZ* and *vabR*::*lacZ* fusions showed an unexpected response in the *fur* mutant. On

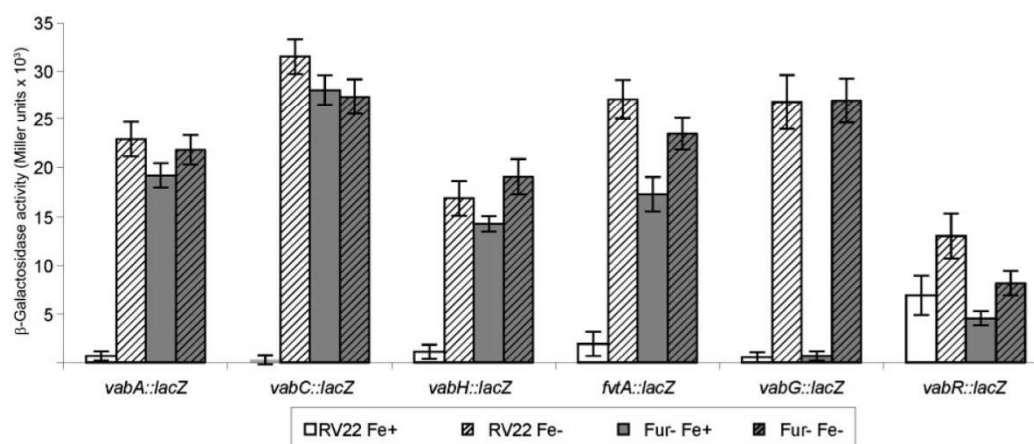


Fig. 4. Transcriptional analysis of the vanchrobactin biosynthesis genes carried out with *lacZ* fusions. Bars indicate β -galactosidase activities of cultures grown under iron-sufficient or iron-deficient conditions (CM9 plus 10 μ M ferric sulfate or 5 μ M EDDA). β -Galactosidase activities were assayed in the parental strain RV22 and in the 775met11 *fur* mutant.

the one hand, the *vabG::lacZ* fusion maintained a drastic iron-dependent repression in the *fur* mutant (Fig. 4). This result indicates that *vabG* transcriptional regulation is iron-dependent, but that Fur is not essential for this repression. Thus, there must be another regulator that controls the response of *vabG* to iron. The iron-dependent regulation of *vabG* is consistent with the above suggested role of VabG as a DAHP synthase mainly involved in siderophore biosynthesis.

Furthermore, the *vabR::lacZ* fusion maintained the reduction in β -galactosidase levels under high-iron conditions at $55 \pm 12\%$ of the levels shown under low-iron conditions. This fusion showed a similar β -galactosidase activity reduction in the *Fur*-deficient strain ($64 \pm 16\%$), which indicates that some levels of iron-mediated repression are still present in the absence of *Fur* (Fig. 4). This therefore suggests that *Fur* is not the main iron-responsive regulator of *vabR*. Notably, the maximal expression of the *vabR::lacZ* fusion achieved in strain 775met11 was reduced by more than 40% when compared to expression levels in the RV22 strain. This reduction could be explained in part by the fact that the 775met11 strain is not isogenic with RV22 and does not produce vanchrobactin.

The results obtained with *vabG::lacZ* and *vabR::lacZ* fusions suggest the necessary existence of additional regulation mechanisms different from *Fur*. Our results clearly indicate that: (1) *vabG* and *vabR* are iron regulated; (2) there is evidence that the *vabG-vabR* intergenic region harbours a *Fur* box, since it yields a strong FURTA-positive phenotype when transformed into the indicator strain H1717; (3) these results do not rule out the possibility that *Fur* plays a significant role in the regulation of either *vabG* or *vabR*, or both. In the absence of *Fur*, we found evidence of a strong iron-mediated repression. It could be that the repression of *vabG/vabR* is carried out by *Fur* as well as by a yet uncharacterized repressor, and that in the absence of *Fur*, this second repressor by itself accounts for nearly the same level of repression. Additional studies would be necessary to understand the role of the *Fur*-mediated repression in the expression of these two genes. It is also recognized that *Fur* may exert its effect indirectly by altering the expression of activators required for the expression of iron-regulated genes. Studies of the regulation of anguibactin biosynthesis genes, encoded in the pJM1 plasmid, have demonstrated that, in addition to the general mechanism mediated by *Fur* repression (Tolmasky & Crosa, 1991), other plasmid-encoded factors play a role in regulation, including the AngR protein (Tolmasky *et al.*, 1993; Wertheimer *et al.*, 1999), the trans-acting factor(s) (TAF) (Welch *et al.*, 2000), and an antisense RNA, RNA_z (Chen & Crosa, 1996; Stork *et al.*, 2007).

Thus, transcriptional *lacZ* fusions evaluated under low- and high-iron conditions demonstrate that all these genes are strongly iron regulated, as suggested by the RT-PCR experiments (see above). However, the data we obtained using the two approaches do not show an exact correlation.

As an example, the expression of the *vabG* gene promoter showed a strong repression under high-iron conditions when measured by β -galactosidase assays, whereas the respective RT-PCR assay still showed a detectable amount of PCR product (Fig. 2b). We consider that the studies of *lacZ* fusion data are more suitable for quantitative comparisons than the RT-PCR assays, since the PCR-based exponential amplification of the RNA transcripts originally present in the sample could lead to an overestimation of the actual gene expression levels.

***vabR* encodes a putative LysR-family activator, and its deletion affects *vabG* expression**

VabR is similar to members of the LTTR family, which is the largest family of prokaryotic DNA-binding transcriptional factors (Schell, 1993). The domain analysis of VabR (a total of 286 residues) shows a LysR substrate domain from residues 61 to 278, which includes the helix–turn–helix DNA-binding motif at its N terminus. Most LTTRs are encoded by genes that are transcribed divergently from their target genes, and operate as transcriptional regulators activating expression together with a small molecule ligand that acts as a coinducer (Gallegos *et al.*, 1997; Schell, 1993). Notably, *vabR* and *vabG* are divergently transcribed (Fig. 2a), which suggests that *vabR* could exert a regulatory effect on *vabG*. To test this hypothesis, we designed an in-frame deletion mutant (MB53). This mutant did not show any significant alteration in vanchrobactin production or in the ability of *V. anguillarum* to grow under iron-limiting conditions (Fig. 3).

We then introduced the transcriptional fusion *vabG::lacZ* into the $\Delta vabR$ mutant, and compared the expression pattern from the *vabG* promoter with that obtained in the RV22 parental strain. As expected, this fusion was strongly repressed under conditions of iron excess, showing expression levels similar to those of the RV22 background. However, under iron-limiting conditions, the *vabR* mutant (MB53) strain showed a significant reduction of β -galactosidase activity of about 35–40% with respect to the wild-type RV22 (Fig. 5). These results clearly indicate that *vabR* encodes a regulatory factor necessary for maximal *vabG* expression. Other reported examples of LTTRs that cooperate with *Fur* in the regulation of gene expression include amino acid biosynthesis (Panina *et al.*, 2001), virulence (Watnick *et al.*, 1998) and iron uptake (Litwin & Quackenbush, 2001; Vasil *et al.*, 1998).

We have demonstrated that *vabR* exerts a regulatory role on the divergently transcribed *vabG* gene. However, it remained to be tested whether VabR also influences the expression of other vanchrobactin biosynthesis and transport genes, as well as regulating its own gene expression. To ascertain these possibilities, we introduced all the remaining gene fusions (*vabH::lacZ*, *fvtA::lacZ*, *vabC::lacZ*, *vabA::lacZ* and *vabR::lacZ*) into the *vabR* mutant. The results demonstrated that mutation of *vabR* did not have any detectable effect on the β -galactosidase activities of

M. Balado, C. R. Osorio and M. L. Lemos

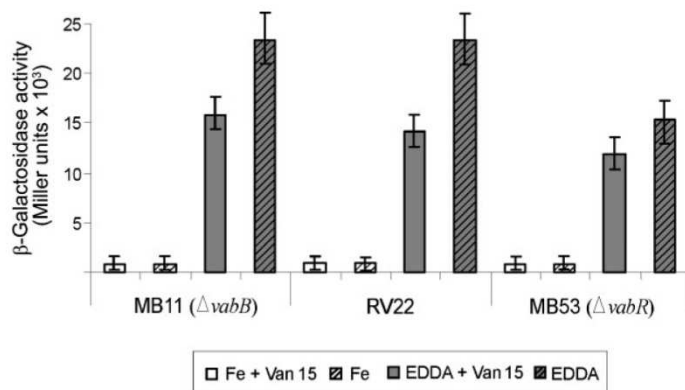


Fig. 5. Transcriptional analysis of the *vabG* gene promoter carried out with *lacZ* fusions. Bars indicate β -galactosidase activities of cultures grown under iron-sufficient or iron-deficient conditions (CM9 plus 10 μ M ferric sulfate or 1.25 μ M EDDA) and in presence of 15 ng vanchrobactin ml^{-1} (Van 15). The β -galactosidase activity of transcriptional fusions was assayed in the parental strain RV22, in MB11 (*vabB* mutant) and in MB53 (*vabR* mutant).

these promoters (data not shown). Thus, it was demonstrated that *vabR* transcription is not self-regulated, and that the only direct target of VabR in the cluster described in this study is *vabG*.

We also tested whether VabR is involved in the regulation of *vabG* in response to vanchrobactin. To assess this possibility we measured *vabG::lacZ* expression in the presence and absence of exogenously added vanchrobactin, in strains MB11 ($\Delta vabB$) and MB53 ($\Delta vabR$), as well as in the parental strain. As shown in Fig. 5, under iron-sufficient conditions, no significant differences were observed in the mutants with respect to the parental strain. However, under iron-deficient conditions (1.25 μ M EDDA), addition of 15 ng vanchrobactin ml^{-1} caused a decrease of between 33 and 36% in the β -galactosidase values in the three assayed strains. This can be explained, as the addition of exogenous vanchrobactin is expected to produce a relaxation in the conditions of iron deficiency, leading to a lighter repression of the *vabG* promoter. Taking all the results into consideration, vanchrobactin is likely not involved in the VabR-mediated activation of the *vabG* promoter.

Transcriptional analysis of *fvtA::lacZ* in a vanchrobactin-deficient *vabB* mutant: dependence on a positive transcriptional regulator

The promoter region of *fvtA* contains a putative AraC box. This suggests that the *fvtA* gene is subjected to some kind of positive regulation. To ascertain this possibility, we introduced the *fvtA::lacZ* fusion into the parental strain as well as into the *vabB* mutant (MB11), and measured the β -galactosidase activities. We used less restrictive iron-limiting conditions (1.25 μ M EDDA) in order to allow growth of the *vabB* mutant and allow the comparison of the *vabB* data with those obtained with the parental strain. Under these conditions, no significant differences were observed in the β -galactosidase activity values between the parental and mutant strain (data not shown). Interestingly,

under iron-rich conditions, we found that the β -galactosidase activity of the *fvtA::lacZ* fusion into the *vabB* mutant was only $1.18 \pm 0.74\%$ of the activity observed under conditions of iron limitation. However, this same fusion into the parental strain RV22 yielded an appreciable basal expression level ($7.3 \pm 2.1\%$ of the expression levels under iron limitation) (Fig. 6). These results indicate that this promoter is downregulated in the absence of vanchrobactin (a sixfold decrease), and suggest that the Fe-siderophore complex plays a positive regulatory role. To test this possibility, we added purified vanchrobactin (at 15 and 30 ng ml^{-1}) to cultures of the *vabB* mutant, and analysed the variation in the β -galactosidase activities of the *fvtA::lacZ* fusion. The results showed an increase higher than threefold in the expression levels of the *fvtA* promoter (Fig. 6). This effect was vanchrobactin-dependent in a linear fashion, since by doubling the amount of vanchrobactin the β -galactosidase activity was similarly doubled. Remarkably, the addition of vanchrobactin to the

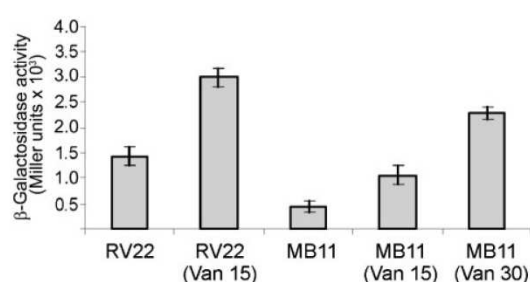


Fig. 6. Transcriptional analysis of the *fvtA* gene promoter carried out with *lacZ* fusions. The β -galactosidase activities are shown of cultures growing under iron-sufficient conditions (CM9 plus 10 μ M ferric sulfate). The β -galactosidase activity of transcriptional fusions was assayed in the parental strain RV22 and in the MB11 ($\Delta vabB$) vanchrobactin synthesis-defective mutant. Van 15, addition of vanchrobactin at 15 ng ml^{-1} ; Van 30, addition of vanchrobactin at 30 ng ml^{-1} .

parental strain harbouring the *fvfA::lacZ* fusion also resulted in a similar increase (Fig. 6). We also tested whether vanchrobactin is involved in the regulation of the transcription of other genes of the cluster. The analysis of the *vabH::lacZ*, *vabC::lacZ*, *vabA::lacZ* and *vabR::lacZ* fusions in strain MB11 ($\Delta vabB$) showed no significant differences in gene expression with respect to the parental strain (data not shown).

It has been reported that micro-organisms are able to sense siderophores in the extracellular environment, resulting in an upregulation of the siderophore uptake genes. One of these mechanisms is based on the activation of target genes by means of an AraC-type protein that requires the presence of the cognate siderophore to bind to specific promoter sequences (Anderson & Armstrong, 2004; Brickman *et al.*, 2001; Fetherston *et al.*, 1996; Pelludat *et al.*, 1998). It is tempting to speculate that the siderophore vanchrobactin is the effector molecule, activating a yet-uncharacterized AraC-type regulator that binds at the conserved AraC box in the *fvfA* promoter (Fig. 2). Our observation that the *fvfA* promoter is downregulated in the absence of vanchrobactin reinforces this hypothesis.

Conclusion

The results reported here indicate that the biosynthesis of the siderophore vanchrobactin in *V. anguillarum* proceeds through an NRPS-mediated pathway that is subjected to a complex regulatory network. Positive and negative regulatory mechanisms are involved, likely aimed at adjusting vanchrobactin production for the maintenance of iron homeostasis in *V. anguillarum*. A proposed model for the regulation of vanchrobactin synthesis and uptake is schematically summarized in Fig. 1. Future work will be directed to fill some of the gaps in our current knowledge of the regulatory network.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant AGL2006-00697 from the Ministry of Education and Science of Spain (cofunded by the FEDER Programme from the European Union) and grant PGIDIT04RMA261014PR-3 from Xunta de Galicia to M.L.L., and M.B. is the recipient of an FPI fellowship from the Ministry of Education and Science of Spain.

REFERENCES

- Alice, A. F., Lopez, C. S. & Crosa, J. H. (2005). Plasmid- and chromosome-encoded redundant and specific functions are involved in biosynthesis of the siderophore anguibactin in *Vibrio anguillarum* 775: a case of chance and necessity? *J Bacteriol* **187**, 2209–2214.
- Anderson, M. T. & Armstrong, S. K. (2004). The BfeR regulator mediates enterobactin-inducible expression of *Bordetella* enterobactin utilization genes. *J Bacteriol* **186**, 7302–7311.
- Arnold, L. E. (1937). Colorimetric determination of the components of 3,4 dihydroxyphenyl-alanine-tyrosine mixtures. *J Biol Chem* **118**, 531–537.
- Balado, M., Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2006). A gene cluster involved in the biosynthesis of vanchrobactin, a chromosome-encoded siderophore produced by *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* **152**, 3517–3528.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S. & other authors (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**, D138–D141.
- Braun, V. & Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**, 104–109.
- Braun, V., Hantke, K. & Koster, W. (1998). Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst* **35**, 67–145.
- Brickman, T. J., Kang, H. Y. & Armstrong, S. K. (2001). Transcriptional activation of *Bordetella* alcaligin siderophore genes requires the AlcR regulator with alcaligin as inducer. *J Bacteriol* **183**, 483–489.
- Butterton, J. R., Stoeber, J. A., Payne, S. M. & Calderwood, S. B. (1992). Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of *viuA*, the gene encoding the ferric vibriobactin receptor of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **174**, 3729–3738.
- Challis, G. L. (2005). A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **6**, 601–611.
- Chen, Q. & Crosa, J. H. (1996). Antisense RNA, Fur, iron, and the regulation of iron transport genes in *Vibrio anguillarum*. *J Biol Chem* **271**, 18885–18891.
- Chen, Q., Actis, L. A., Tolmasky, M. E. & Crosa, J. H. (1994). Chromosome-mediated 2,3-dihydroxybenzoic acid is a precursor in the biosynthesis of the plasmid-mediated siderophore anguibactin in *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **176**, 4226–4234.
- Conchas, R. F., Lemos, M. L., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1991). Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2956–2962.
- Crosa, J. H. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev* **53**, 517–530.
- Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 223–249.
- de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M. & Neilands, J. B. (1987). Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J Bacteriol* **169**, 2624–2630.
- Di Lorenzo, M., Stork, M., Tolmasky, M. E., Actis, L. A., Farrell, D., Welch, T. J., Crosa, L. M., Wertheimer, A. M., Chen, Q. & other authors (2003). Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J Bacteriol* **185**, 5822–5830.
- Escobar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**, 6223–6229.
- Fetherston, J. D., Bearden, S. W. & Perry, R. D. (1996). YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol* **22**, 315–325.
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K. & Ramos, J. L. (1997). AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 393–410.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- Hantke, K. (1987). Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet* **210**, 135–139.

- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**, 6557–6567.
- Hodgson, D. A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol* **42**, 47–238.
- Kloosterman, H., Hessels, G. I., Vrijbloed, J. W., Euverink, G. J. & Dijkhuizen, L. (2003). (De)regulation of key enzyme steps in the shikimate pathway and phenylalanine-specific pathway of the actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *Microbiology* **149**, 3321–3330.
- Lemos, M. L., Salinas, P., Toranzo, A. E., Barja, J. L. & Crosa, J. H. (1988). Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **170**, 1920–1925.
- Litwin, C. M. & Quackenbush, J. (2001). Characterization of a *Vibrio vulnificus* LysR homologue, HupR, which regulates expression of the haem uptake outer membrane protein, HupA. *Microb Pathog* **31**, 295–307.
- Liu, Q., Ma, Y., Zhou, L. & Zhang, Y. (2005). Gene cloning, expression and functional characterization of a phosphopantetheinyl transferase from *Vibrio anguillarum* serotype O1. *Arch Microbiol* **183**, 37–44.
- Masse, E. & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4620–4625.
- Michel, L., Gonzalez, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T. & Reimann, C. (2005). PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol* **58**, 495–509.
- Miethe, M., Westers, H., Blom, E. J., Kuipers, O. P. & Marahiel, M. A. (2006). Iron starvation triggers the stringent response and induces amino acid biosynthesis for bacillibactin production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 8655–8657.
- Miller, J. H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mouriño, S., Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2004). Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **186**, 6159–6167.
- Osorio, C. R., Juiz-Rio, S. & Lemos, M. L. (2006). A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Microbiology* **152**, 3327–3341.
- Panina, E. M., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2001). Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in gamma-proteobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 529–543.
- Panina, E. M., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2003). Regulation of biosynthesis and transport of aromatic amino acids in low-GC Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **222**, 211–220.
- Parales, R. E. & Harwood, C. S. (1993). Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram[−] bacteria. *Gene* **133**, 23–30.
- Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C. A., Schubert, S. & Heesemann, J. (1998). The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol* **180**, 538–546.
- Pittard, J., Camakaris, H. & Yang, J. (2005). The TyrR regulon. *Mol Microbiol* **55**, 16–26.
- Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 881–941.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**, 597–626.
- Schwarzer, D., Finking, R. & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* **20**, 275–287.
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47–56.
- Soengas, R. G., Anta, C., Espada, A., Paz, V., Ares, I. R., Balado, M., Rodriguez, J., Lemos, M. L. & Jiménez, C. (2006). Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Tetrahedron Lett* **47**, 7113–7116.
- Stojiljkovic, I., Baumler, A. J. & Hantke, K. (1994). Fur regulon in Gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J Mol Biol* **236**, 531–545.
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T. J., Crosa, L. M. & Crosa, J. H. (2002). Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* **48**, 222–228.
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T. J. & Crosa, J. H. (2007). Transcription termination within the iron transport-biosynthesis operon of *Vibrio anguillarum* requires an antisense RNA. *J Bacteriol* **189**, 3479–3488.
- Tabor, S. & Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1074–1078.
- Tolmasky, M. E. & Crosa, J. H. (1991). Regulation of plasmid-mediated iron transport and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Biol Met* **4**, 33–35.
- Tolmasky, M. E., Actis, L. A. & Crosa, J. H. (1993). A single amino acid change in AngR, a protein encoded by pJM1-like virulence plasmids, results in hyperproduction of anguibactin. *Infect Immun* **61**, 3228–3233.
- Tolmasky, M. E., Wertheimer, A. M., Actis, L. A. & Crosa, J. H. (1994). Characterization of the *Vibrio anguillarum* *fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *J Bacteriol* **176**, 213–220.
- Toranzo, A. E. & Barja, J. L. (1990). A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis Aquat Organ* **9**, 73–82.
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**, 1–6.
- Vasil, M. L., Ochsner, U. A., Johnson, Z., Colmer, J. A. & Hamood, A. N. (1998). The *fur*-regulated gene encoding the alternative sigma factor PvdS is required for iron-dependent expression of the LysR-type regulator *ptxR* in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**, 6784–6788.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**, 611–647.
- Wang, R. F. & Kushner, S. R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**, 195–199.
- Watnick, P. I., Butters, J. R. & Calderwood, S. B. (1998). The interaction of the *Vibrio cholerae* transcription factors, Fur and IrgB, with the overlapping promoters of two virulence genes, *irgA* and *irgB*. *Gene* **209**, 65–70.

Webster, A. C. & Litwin, C. M. (2000). Cloning and characterization of *vuuA*, a gene encoding the *Vibrio vulnificus* ferric vulnibactin receptor. *Infect Immun* **68**, 526–534.

Welch, T. J., Chai, S. & Crosa, J. H. (2000). The overlapping *angB* and *angG* genes are encoded within the *trans*-acting factor region of the virulence plasmid in *Vibrio anguillarum*: essential role in siderophore biosynthesis. *J Bacteriol* **182**, 6762–6773.

Wertheimer, A. M., Verweij, W., Chen, Q., Crosa, L. M., Nagasawa, M., Tolmasky, M. E., Actis, L. A. & Crosa, J. H. (1999). Characterization of

the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. *Infect Immun* **67**, 6496–6509.

Wolf, M. K. & Crosa, J. H. (1986). Evidence for the role of a siderophore in promoting *Vibrio anguillarum* infections. *J Gen Microbiol* **132**, 2949–2952.

Yanofsky, C. (2000). Transcription attenuation: once viewed as a novel regulatory strategy. *J Bacteriol* **182**, 1–8.

Edited by: S. C. Andrews

FvtA Is the Receptor for the Siderophore Vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*: Utility as a Route of Entry for Vanchrobactin Analogues[†]

Miguel Balado, Carlos R. Osorio, and Manuel L. Lemos*

Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Aquaculture and Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, Campus Sur, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 19 December 2008/Accepted 1 March 2009

Some strains of *Vibrio anguillarum*, the causative agent of vibriosis in a variety of marine animals, produce a catechol-type siderophore named vanchrobactin. The biosynthetic pathway and regulation of vanchrobactin are quite well understood. However, aspects concerning its entry into the cell have remained uncharacterized. In the present study we characterized two genes, *fvtA* and *orf13*, encoding potential TonB-dependent ferric-vanchrobactin receptors in serotype O2 *V. anguillarum* strain RV22. We found that an *fvtA* mutant was defective for growth under iron limitation conditions and for utilization of vanchrobactin, suggesting that *fvtA* encodes the vanchrobactin receptor of *V. anguillarum*. Interestingly, an *orf13* mutant was not significantly affected, and results of reverse transcriptase PCR, as well as analysis of outer membrane proteins by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, suggested that this gene is not expressed. Furthermore, *fatA*, a plasmid gene coding for the anguibactin receptor in plasmid pJM1-harboring strains, is also present in the chromosome of RV22, although it is inactivated by insertion of transposases. In addition, we found that FvtA is the route of entry for vanchrobactin analogues, and there is evidence that it recognizes primarily the catechol-iron center. These analogues are potential candidate vectors for a Trojan horse strategy aimed at generating antimicrobial compounds exploiting the same route of entry for native siderophores. We found that *fvtA* and vanchrobactin biosynthesis genes are ubiquitous in both vanchrobactin- and anguibactin-producing *V. anguillarum* strains, which reinforces the utility of the vanchrobactin route of entry for the design of future strategies for the control of vibriosis.

Vibrio anguillarum strains possess an array of specific virulence factors that enable them to cause a hemorrhagic septicemia called vibriosis in a variety of marine animals (41). There are more than 20 recognized serotypes, but serotypes O1 and O2 are the serotypes predominantly implicated in vibriosis outbreaks (43). Although the virulence mechanisms of *V. anguillarum* are not fully understood, it is known that the ability to scavenge iron through utilization of siderophores contributes significantly to the virulence of this bacterium (11, 20, 45). Currently, two clearly different siderophore-mediated iron uptake systems in *V. anguillarum* are known. One of them is the vanchrobactin-mediated system encoded by a chromosomal gene cluster. The chemical structure of the siderophore in this system and its biosynthesis and regulation pathways were recently established (3, 4, 36). The other system is a plasmid pJM1-encoded system called the anguibactin system that is found only in pJM1-containing serotype O1 strains (10, 40), whose synthesis requires additional chromosomal genes that are also involved in vanchrobactin production (1, 4).

Uptake of ferric iron-siderophore complexes into the cell requires a specific outer membrane (OM) receptor protein

connected to a TonB-ExbB-ExbD complex that produces the energy necessary for active transport (6, 12). Two functional *tonB* systems have been identified in *V. anguillarum*, and the *tonB2* system is essential for transport of siderophores and virulence (39). The ferric iron-anguibactin complex is transported via the OM receptor FatA, the periplasmic binding protein FatB, and the inner membrane proteins FatC and FatD (ABC transporter) (40). Although the genetic basis of anguibactin transport has been well characterized, little is known about how *V. anguillarum* vanchrobactin-producing strains transport the ferric iron-vanchrobactin complexes into the cell.

Increasing antibiotic-mediated selective pressure has led to the emergence of multiresistant strains of many bacterial pathogens, and fish pathogens are no exception. To facilitate penetration of antibiotics into bacterial cells, the so-called “Trojan horse strategy” can be employed, where antimicrobial drugs are transported across the bacterial membranes by exploiting the iron uptake pathways (7, 8, 24, 26, 34, 38). The vanchrobactin chemical structure was recently determined, and a series of vanchrobactin analogues which have functionality (an amino group) appropriate for use as antibiotic vectors and keep their siderophore activity have been synthesized and evaluated (36, 37). Similar approaches have been used and have provided promising results with the pyoverdine-mediated iron uptake system (18) and conjugated siderophore- β -lactamase inhibitors (9).

In previous studies, a gene cluster (*vab* cluster) encoding the functions involved in the biosynthesis of vanchrobactin and its

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Aquaculture, University of Santiago de Compostela, Campus Sur, 15782 Santiago de Compostela, Spain. Phone: 34-981563100, ext. 16080. Fax: 34-981547165. E-mail: manuel.lemos@usc.es.

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 6 March 2009.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Plasmid or strain	Relevant characteristic(s)	Source or reference
Plasmids		
pGEMT-Easy	PCR cloning vector, Amp ^r	Promega
pWKS30	Low-copy-number cloning vector, Amp ^r	44
pNidKan	<i>pir</i> -dependent suicide plasmid, pCVD442 derivative, <i>sacB</i> , Kan ^r	27
pHRP309	Low-copy-number vector, Gm ^r	30
MBcos167	Cosmid containing <i>orf13</i>	3
MBcos69	Cosmid containing <i>vabD</i>	3
pMB54	<i>fvfA</i> gene and promoter cloned in pHRP309, Gm ^r	This study
<i>V. anguillarum</i> strains		
RV22	Serotype O2 strain isolated from diseased turbot	20
MB11	RV22 $\Delta vabB$	4
MB84	RV22 $\Delta fvtA$	This study
MB70	RV22 $\Delta orf13$	This study
MB90	RV22 $\Delta fvtA \Delta orf13$	This study
MB102	RV22 $\Delta vabB \Delta fvtA$	This study
MB104	RV22 $\Delta vabB \Delta orf13$	This study
MB107	RV22 $\Delta vabB \Delta fvtA \Delta orf13$	This study
<i>E. coli</i> S17-1- λ pir	Tp ^r Sm ^r , <i>recA thi pro hsdR-M+RP4::2-Tc::Muc::Km Tn7</i> λ pir	19

regulation was widely characterized (3, 4). The *fvfA* gene, linked to the biosynthetic genes, was initially postulated to encode a vanchrobactin receptor (3), and it is known that *V. anguillarum* senses ferric-vanchrobactin in the extracellular environment, resulting in upregulation of the *fvfA* gene (3). However, the actual role of *fvfA* in the vanchrobactin uptake process has not been demonstrated yet. In this paper we functionally characterize the role of *fvfA* in acquisition of ferric-vanchrobactin and the possible utility of using the vanchrobactin acquisition pathway as a strategy for therapy against vibriosis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and media. The strains and plasmids used, including those derived in this study, are listed in Tables 1 and Table 3. *V. anguillarum* strains were grown at 25°C on tryptic soy agar (Difco) supplemented with 1% NaCl and in tryptic soy broth (Difco) supplemented with 1% NaCl, as well as in M9 minimal medium (25) supplemented with 0.2% Casamino Acids (Difco) (CM9). *Escherichia coli* strains were routinely grown at 37°C in Luria-Bertani medium (Pronadisa) supplemented with the appropriate antibiotics. Antibiotics (Sigma-Aldrich) were used at the following final concentrations: ampicillin (sodium salt) and kanamycin, 50 μ g ml⁻¹; and gentamicin, 10 μ g ml⁻¹. Ethylenediamine-di-(*o*-hydroxyphenyl acetic acid) (EDDA) and 2,2'-dipyridyl were used as iron chelators at appropriate concentrations.

DNA manipulations. Total genomic DNA from *V. anguillarum* was purified with an Easy-DNA kit (Invitrogen). Plasmid DNA purification and extraction of DNA from agarose gels were carried out using kits from Qiagen (Qiagen). DNA probe labeling and Southern blot analyses were performed with the ECL DNA labeling and detection system (Amersham Biosciences). DNA probes for gene screening by Southern blotting were obtained by PCR amplification using suitable primer pairs (see Table S1 in the supplemental material). PCRs were routinely carried out using a T-Gradient thermal cycler (Biometa) with *Taq* polymerase BioTaq (Bioline).

DNA sequencing and bioinformatics tools. DNA sequences were determined by the dideoxy chain termination method for either cosmid, plasmid, or PCR products using a GenomeLab DTCS quick start kit with a CEQ 8000 DNA sequencer (Beckman Coulter). Sequences were examined and assembled using BioEdit, version 7.0.4.1 (16). The European Bioinformatics Institute and the NCBI services were used to consult DNA and protein sequence databases with FASTA3 and BLAST algorithms.

Construction of *fvfA* and *orf13* mutants by allelic exchange. In-frame deletions of *fvfA* and *orf13* in *V. anguillarum* RV22 were constructed by using PCR amplification of two fragments of each gene and flanking regions, which, when

ligated together, would result in an in-frame (nonpolar) deletion. The oligonucleotides used to amplify the upstream and downstream ends of each gene are shown in Table S1 in the supplemental material. Each deleted allele construction was ligated into the suicide vector pNidKan (27). As a pCVD442 derivative, pNidKan contains R6K *ori*, requiring the *pir* gene product for replication, and the *sacB* gene, conferring sucrose sensitivity. The resulting plasmids were mated from *E. coli* S17-1- λ pir into *V. anguillarum* wild-type strain RV22 and into previously constructed mutant strains, and exconjugants with the plasmid (conferring kanamycin resistance) integrated into the chromosome by homologous recombination were selected. A second recombination event involved selecting for sucrose (10%) resistance and further checking for plasmid loss and for allelic exchange. This process led to the generation of *V. anguillarum* single mutant strains MB84 ($\Delta fvtA$) and MB70 ($\Delta orf13$) and mutants MB102 ($\Delta vabB \Delta fvtA$), MB104 ($\Delta vabB \Delta orf13$), and MB107 ($\Delta vabB \Delta fvtA \Delta orf13$). Deletion of the parental gene was checked by Southern blot hybridization, and DNA sequencing of the region involved in the deletion was carried out to ensure that all mutations were in frame.

Complementation of *V. anguillarum* *fvfA* mutants. The *fvfA* gene, along with its promoter sequence, was PCR amplified from the *V. anguillarum* RV22 chromosome using specific primers (see Table S1 in the supplemental material), cloned into the pHRP309 vector (30), and subsequently transformed into *E. coli* strain S17-1- λ pir. The resulting plasmid (Table 1) was mated from *E. coli* S17-1- λ pir into the *V. anguillarum* *fvfA* mutant, and transformants were selected on agar medium containing gentamicin (resistance conferred by pHRP309) and ampicillin (to select for *V. anguillarum*).

Growth under iron-limited conditions and test for siderophore production. To test the ability of *V. anguillarum* deletion mutants to grow under iron-limited conditions, the optical densities at 600 nm (OD₆₀₀) of overnight cultures in Luria-Bertani medium of the parental and mutant strains were adjusted to 0.5, and the cultures were diluted 1:15 in CM9 containing 10 μ M EDDA. In the case of the complemented *fvfA* mutant, gentamicin was added to avoid loss of plasmid pMB54. Cultures were incubated at 25°C with shaking at 150 rpm, and growth (OD₆₀₀) was measured after 12 h of incubation. Siderophore production was measured using the chrome azurol S (CAS) liquid assay (35), which detects the presence of iron-chelating compounds. For siderophore production, strains were grown with 5 μ M EDDA instead of 10 μ M EDDA to allow cultures to grow enough to make siderophore secretion detectable. A noninoculated sample of CM9 containing EDDA at an appropriate concentration and a sample of the *vabB* mutant (MB11) were used as a spectrophotometric blank and as a negative control for the CAS liquid assay, respectively. Growth curve and CAS assays were carried out in triplicate, and the results shown below are the means of three independent experiments.

OM protein analysis. *V. anguillarum* strains were grown in CM9 supplemented with either 10 μ M Fe₂(SO₄)₃ or 5 μ M EDDA (iron-sufficient or iron-restricted conditions, respectively). Cells were centrifuged, and OM proteins were obtained as previously described (42). The protein concentration was adjusted for all the

samples, and proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The protein bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue.

Cross-feeding assays. The biological activities of vanchrobactin and analogues of this compound were determined by using bioassays. Strains MB11 ($\Delta vabB$), MB102 ($\Delta vabB \Delta fvtA$), MB104 ($\Delta vabB \Delta orf13$), and MB107 ($\Delta vabB \Delta fvtA \Delta orf13$), used as indicator strains, were inoculated into CM9 containing the iron chelator 2,2'-dipyridyl at a concentration of 120 μ M, a concentration higher than the MIC for the wild-type strain. Paper disks were loaded with 25 μ g of each compound and put on the surfaces of the plates. The compounds tested were synthetic vanchrobactin (2,3-dihydroxybenzoic acid [DHBA]-Arg-Ser) and several synthetic derivatives with known siderophore activity, including DHBA-Orn, DHBA-Orn-Ser, DHBA-Ser, DHBA-Ser-Orn, DHBA-Ser-Arg, and DHBA-Arg (37), that could be the vanchrobactin esterase product. The results were considered positive when a compound promoted the growth of indicator strains. A 10 μ M $Fe_2(SO_4)_3$ solution was used as a positive growth control.

RNA purification and RT-PCR. *V. anguillarum* cultures (5 ml) were grown until exponential phase in low-iron CM9 containing 5 μ M EDDA, and total RNA was isolated with the RNA isolation reagent RNAwiz (Ambion) by following the manufacturer's recommendations. Reverse transcriptase (RT) PCRs were performed with 0.5 to 3 μ g of RNA pretreated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) by using the Moloney murine leukemia virus RT (Invitrogen). Negative controls for PCR were performed with total RNA without Moloney murine leukemia virus RT to confirm the lack of genomic DNA contamination in each reaction mixture. A primer pair flanking a 639-bp internal fragment of the *fvtA* gene was used to PCR amplify the cDNA from *fvtA* transcripts (see Table S1 in the supplemental material).

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence reported in this study has been deposited in the EMBL database under accession number AM168450.

RESULTS AND DISCUSSION

The vanchrobactin gene cluster includes two genes encoding predicted TonB-dependent ferric iron-siderophore receptors. The vanchrobactin biosynthesis gene cluster (*vab* cluster) includes a gene designated *fvtA* encoding a protein with high levels of similarity to TonB-dependent siderophore receptors. Expression of *fvtA* is known to be iron regulated via the Fur repressor, and *fvtA* is cotranscribed with *vabD*, a gene encoding a phosphopantetheinyl transferase essential for vanchrobactin biosynthesis. In addition, expression of *fvtA* was found to be vanchrobactin dependent (3). These findings, together with homology data, suggested that FvtA could be the vanchrobactin receptor, although no direct experimental data confirmed this hypothesis.

Using *V. anguillarum* RV22 cosmid clones identified in a previous study (3), we extended DNA sequencing on both sides of the *vab* cluster and identified a previously undescribed gene designated *orf13* downstream of *vabR* and transcribed from the same strand (Fig. 1). *VabR* is a predicted LysR family regulator that activates expression of *vabG*, a gene encoding a 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase involved in vanchrobactin biosynthesis (3). Downstream of *orf13* we found a putative lipase gene. On the other side of the *vab* cluster, sequencing downstream of *vabD* yielded a gene encoding a putative NADH-quinone reductase (Fig. 1). We believe that the *vab* cluster sequence might now be complete, since the proteins encoded by the two new genes at the borders of this cluster (lipase and NADH-quinone reductase) do not show any known relationship with siderophore synthesis or transport proteins, as deduced from protein database homology searches. Interestingly, the predicted protein encoded by *orf13* showed homology with, among other proteins, FepA, the OM receptor for ferrienterochelin and colicins of *Vibrio*

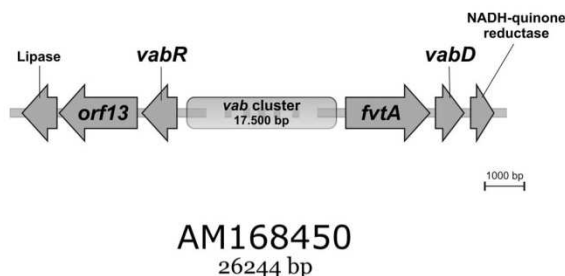


FIG. 1. Physical map of the *V. anguillarum* RV22 *vab* cluster, showing newly sequenced genes at the borders of the previously sequenced *vab* genes (4). Flanking genes encoding a predicted lipase and an NADH-quinone reductase are thought to be not part of the *vab* cluster.

alginolyticus (accession no. ZP_01260504; 59% identity and 77% similarity), and IrgA, the enterobactin receptor of *Vibrio cholerae* (accession no. ZP_01950374; 44% identity and 60% similarity) (14).

The extended *vab* cluster, as described here, includes two genes which encode potential OM receptors for vanchrobactin. Alignment of these two protein sequences with the sequences of described TonB-dependent receptors (data not shown) showed that there was conservation of some residues near the N termini of both FvtA (DETVVVVGE) and ORF13 (MET LVYTAS) (residues conserved in other TonB-dependent ferric siderophore receptors are underlined), which might be involved in direct interaction with the TonB protein (the so-called TonB box) (15, 22, 29). In addition, various OM proteins possess a highly conserved C-terminal sequence, which was proposed to form an amphipathic β -sheet important for correct assembly of the protein in the OM (13). This sequence motif also is present in ORF13 and FvtA and in other OM TonB-dependent siderophore and heme receptors of other *Vibrio* species.

FvtA is directly involved in ferric-vanchrobactin uptake. Since *fvtA* and *orf13* are part of the *vab* cluster and are closely linked to other genes whose role in vanchrobactin biosynthesis has already been demonstrated, these two genes are candidates for the genes that encode the ferric-vanchrobactin OM receptor. In order to assess this possibility, in-frame deletion mutants were constructed by allelic exchange, and their ability to grow under iron limitation conditions was evaluated. As a control, we also included in these experiments the vanchrobactin biosynthesis mutant MB11 ($\Delta vabB$) (3). Under iron-sufficient conditions (CM9 plus 10 μ M ferric sulfate), no significant differences in growth rates between the mutants and parental strain RV22 were observed (Fig. 2). However, when the same strains were cultured under iron-restricted conditions (CM9 with 10 μ M EDDA), the growth of the $\Delta fvtA$ mutant (MB84) was significantly impaired (Fig. 2), resulting in growth levels similar to those of the vanchrobactin-deficient mutant, whereas the growth of the $\Delta orf13$ mutant (MB70) was not affected. As expected, a $\Delta fvtA \Delta orf13$ double mutant (MB90) had a phenotype similar to that of the $\Delta fvtA$ single mutant (Fig. 2). Interestingly, analysis of the culture supernatants by the CAS assay showed an increase in the siderophore concentration in

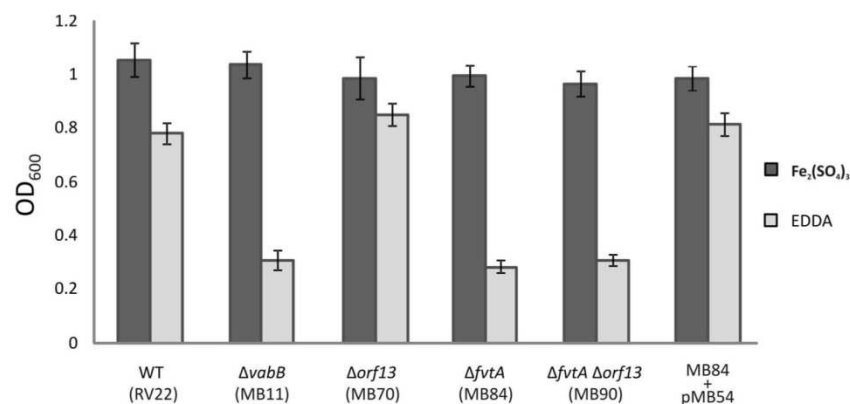


FIG. 2. Growth (OD₆₀₀) after 12 h of incubation of *V. anguillarum* RV22, $\Delta vabB$ (MB11), $\Delta orf13$ (MB70), $\Delta fvtA$ (MB84), and $\Delta fvtA \Delta orf13$ (MB90) mutants, and the MB84 mutant complemented with plasmid pMB54 in CM9 supplemented with Fe₂(SO₄)₃ (10 μM) or the iron chelator EDDA (10 μM). WT, wild type.

the $\Delta fvtA$ mutant compared with the parental strain and the $\Delta orf13$ mutant; at an OD₆₀₀ of approximately 0.6 in CM9 plus 5 μM EDDA, the parental and $\Delta orf13$ strains showed CAS values (A_{630}) of ca. -0.2, while the $\Delta fvtA$ mutant showed CAS assay values (A_{630}) of -0.3 or less (lower values indicate higher siderophore concentrations [35]). Under these conditions, the $\Delta vabB$ mutant showed mean CAS assay values (A_{630}) of -0.015. These results demonstrate that the impaired-growth phenotype of the $\Delta fvtA$ mutant is not due to the lack of vancrobactin production. The increase in siderophore concentration could be explained by the extracellular accumulation of vancrobactin, which is not transported back into the cell. When the $\Delta fvtA$ mutant was complemented with a plasmid harboring an intact *fvtA* gene (pMB54), the growth and CAS assay values were restored to wild-type levels (Fig. 2). All these results clearly suggest that FvtA plays a crucial role in the transport of ferric-vancrobactin.

The OM protein profiles under iron-sufficient and iron-deficient conditions were analyzed for *V. anguillarum* RV22, for three mutants, and for the complemented $\Delta fvtA$ mutant (Fig. 3). The molecular masses of most of the TonB-dependent OM

proteins involved in iron acquisition in gram-negative bacteria fall in the range from 70 to 80 kDa. Several protein bands at molecular masses in this range could be visualized for the parental strain under iron limitation conditions but not under iron-sufficient conditions. However, one of these iron-regulated protein bands (Fig. 3, RV22 Fe- lane) was absent in the lane containing the $\Delta fvtA$ mutant, and it presumably corresponded to the FvtA protein (the predicted molecular mass of FvtA, based on its amino acid sequence, is 78 kDa). This band was also absent in the lane containing the double mutant but not in the lane containing the $\Delta orf13$ mutant, while it was present in the lane containing the complemented $\Delta fvtA$ mutant (Fig. 3). Interestingly, the $\Delta orf13$ mutant showed a pattern identical to that of the parental strain, and similarly, the pattern of the $\Delta fvtA \Delta orf13$ double mutant was the same as that of the $\Delta fvtA$ mutant. Together, these results suggest that *orf13* is not expressed (the predicted molecular mass of ORF13, based on its amino acid sequence, is 71 kDa). This hypothesis was reinforced by the negative results obtained in repeated attempts to detect the presence of *orf13* transcripts by RT-PCR (data not shown). The other iron-regulated protein bands

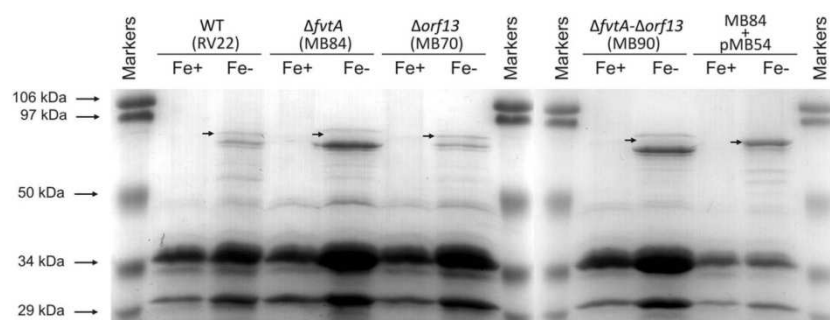


FIG. 3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel of OM proteins obtained from cultures of *V. anguillarum* RV22 (wild type [WT]), $\Delta fvtA$ (MB84), $\Delta orf13$ (MB70), and $\Delta fvtA \Delta orf13$ (MB90) mutants, and the MB84 mutant complemented with plasmid pMB54 under iron-sufficient (Fe+) and iron-deficient (Fe-) conditions. The arrows indicate the locations of the bands corresponding to the iron-regulated putative FvtA protein. The numbers on the left indicate the molecular masses of the protein markers.

TABLE 2. Results of bioassays using vanchrobactin analogues and purified siderophores

Compound	Promotion of the growth of <i>V. anguillarum</i> indicator strains ^a				
	MB11 ($\Delta vabB$)	MB102 ($\Delta vabB$ $\Delta fvtA$)	MB104 ($\Delta vabB$ $\Delta orf13$)	MB107 ($\Delta vabB$ $\Delta fvtA$ $\Delta orf13$)	MB102 (pMB54)
Vanchrobactin (DHBA-Arg-Ser)	+	—	+	—	+
DHBA-Orn	+	—	+	—	+
DHBA-Orn-Ser	+	—	+	—	+
DHBA-Ser	+	—	+	—	+
DHBA-Ser-Arg	+	—	+	—	+
DHBA-Arg	+	—	+	—	+
Amonabactin	—	—	—	—	—
Anguibactin	—	—	—	—	—
Enterobactin	+	(+)	+	(+)	+
Ferrichrome ^b	+	+	+	+	+
Aerobactin ^b	—	—	—	—	—

^a The abilities of the different compounds to promote the growth of each indicator strain are indicated as follows: +, positive; —, negative; (+), weakly positive.

^b Hidroxamate-type siderophore.

whose sizes are close to that of the FvtA band can be attributed to other iron-regulated OM iron transporters that have molecular masses in the range from 70 to 80 kDa, like the heme receptor HuvA (ca. 79 kDa) (23), and molecular masses like those of uncharacterized receptors for exogenous siderophores like ferrichrome (see below).

Synthetic vanchrobactin and vanchrobactin analogues use FvtA as the sole route of entry. As mentioned above, the route of entry of Fe-siderophore complexes into bacterial cells can be exploited by using a Trojan horse strategy for introduction of modified molecules with antimicrobial activity (24, 26). In a previous study, a series of vanchrobactin analogues were found to promote growth of *V. anguillarum* (RV22 and 775 strains) under iron-deficient conditions, indicating that they are indeed internalized and utilized as siderophores (37). However, the route of entry for these analogues into the *V. anguillarum* cell remained unknown. In addition, we ignored which part of the

siderophore mediated the specific recognition by its cognate receptor, information that would be of great interest for selecting which region of the siderophore can be modified without altering its recognition. Bacteria often possess multiple OM receptors, each of which provides the bacterium with specificity for different siderophores, and some receptors have been found to efficiently transport derivatives of their cognate siderophores (12, 17, 32). We therefore wanted to assess the role of FvtA and ORF13 in the uptake of vanchrobactin analogues, using agar plate bioassays. For this purpose, a *vabB* mutant strain (MB11) (mutation of *vabB* abolishes vanchrobactin production) (4) was used as the parental strain to construct $\Delta fvtA$ and $\Delta orf13$ mutants to specifically assay the transport of synthetic vanchrobactin and the most relevant vanchrobactin analogues. Using a $\Delta vabB$ strain, we made sure that the growth halo was directly related to the ability to use the compound on the paper disk rather than to the utilization of endogenous vanchrobactin. The double mutants MB102 ($\Delta vabB$ $\Delta fvtA$) and MB104 ($\Delta vabB$ $\Delta orf13$), as well as the triple mutant MB107 ($\Delta vabB$ $\Delta fvtA$ $\Delta orf13$), were used as indicator strains (Table 2), and the *vabB* single mutant was used as a positive control. Although *orf13* seems not to be expressed, we cannot rule out the possibility that expression of this gene was induced under other conditions (e.g., when a cognate ligand was present). Therefore, *orf13* mutant strains were included in the bioassay experiments as well. The compounds tested are shown in Table 2.

As expected, synthetic vanchrobactin and its analogues promoted growth of MB11 ($\Delta vabB$) and MB104 ($\Delta vabB$ $\Delta orf13$) (Table 2). However, MB102 ($\Delta vabB$ $\Delta fvtA$) and MB107 ($\Delta vabB$ $\Delta fvtA$ $\Delta orf13$) were unable to use any of these compounds, which indicates that FvtA is the transporter for vanchrobactin, as well as for the analogues tested. When MB102 ($\Delta vabB$ $\Delta fvtA$) was complemented with plasmid pMB54 (harboring the *fvtA* gene and its promoter), transport of vanchrobactin and its analogues was restored (Table 2). An interesting finding is that all of the analogues tested share the same moiety, the DHBA molecule. This suggests that the specificity of the *V. anguillarum* vanchrobactin receptor FvtA could be mediated by the iron-catecholate center, whereas the D-

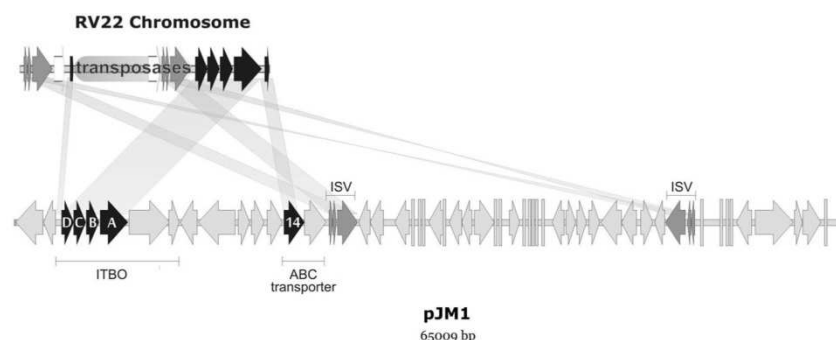


FIG. 4. Comparative analysis of the RV22 chromosomal *fatDCBA* gene cluster and genes of the pJM1 plasmid. The predicted open reading frames in RV22 showed levels of identity near 100% to different pJM1 regions corresponding to *fatDCBA* genes (DCBA), an uncharacterized putative ABC transporter gene (*orf14*) (labeled 14), and transposases (ISV), which have a different organization in RV22 and pJM1. In pJM1, *fatDCBA* form an operon (ITBO) together with the anguibactin biosynthesis genes *angR* and *angT* (11, 40) but not with the ABC transporter gene *orf14*. The open arrows indicate transposases in RV22 that are absent from pJM1. The light gray arrows indicate genes specific to one of the two molecules compared.

TABLE 3. Presence of *vab* cluster genes in a collection of *V. anguillarum* strains as determined by PCR and Southern blot hybridization

Strain	Source	Presence of:									RS1 ^a
		Vanchrobactin biosynthesis and transport genes									
		<i>vabA</i>	<i>vabB</i>	<i>vabC</i>	<i>vabE</i>	<i>vabF</i>	<i>vabS</i>	<i>vabH</i>	<i>fvtA</i>	<i>orf13</i>	
Serotype O1											
TM14	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 43305	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SE56.1	<i>Salmo</i> spp., Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SO121.1	<i>Salmo</i> spp., Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RI33.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SE145.1	<i>Salmo</i> spp., Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PC933.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
96F	<i>Morone saxatilis</i> , United States	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
R82	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
775	<i>Oncorhynchus kisutch</i> , United States	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serotype O2											
ATCC 14181	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
PC640.1	<i>Solea solea</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
CA3.1/04	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
AZ215.1	<i>Solea solea</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
CA13.1	<i>Pollachius pollachius</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
ACC4.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , Portugal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
PC628.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
ATCC 43306	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
RV22	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
43F	<i>Morone saxatilis</i> , United States	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
CA1.1/04	<i>Solea solea</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Serotype O3											
PT-493	<i>Plecoglossus altivelis</i> , Japan	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
11008	<i>Dicentrarchus labrax</i> , France	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
ATCC 43307	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Denmark	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
ET-208	<i>Anguilla japonica</i> , Japan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Serotype O4											
RPM41.11	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
ATCC 43308	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Serotype O5											
ATCC 43309	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Serotype O6											
ATCC 43310	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Serotype O7											
ATCC 43311	<i>Anguilla japonica</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Serotype O8											
ATCC 43312	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Serotype O9											
ATCC 43313	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Serotype O10											
ATCC 43314	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—

^a RS1 is an IS that disrupts the *vabF* gene.

Arg-L-Ser backbone could play a minor role in the recognition. A similar situation has been described for the chrysobactin receptor FctA, where recognition is mediated by the DHBA moiety (31).

Together, our results indicate that FvtA is the only route of entry for vanchrobactin (DHBA-Arg-Ser), as well as for its analogue DHBA-Orn-Ser. Elucidation of the route of entry for the latter molecule was of special interest, since this molecule

possess an amino group that could be used to link antibacterial agents in the Trojan horse strategy (37).

We also tested the utilization of siderophores from other bacterial species. Results of these bioassays (Table 2) demonstrated that ferrichrome can be utilized by the parental strain and by all mutants, indicating that in *V. anguillarum* RV22 a ferrichrome receptor distinct from FvtA and ORF13 is required. Interestingly, enterobactin supported growth of the

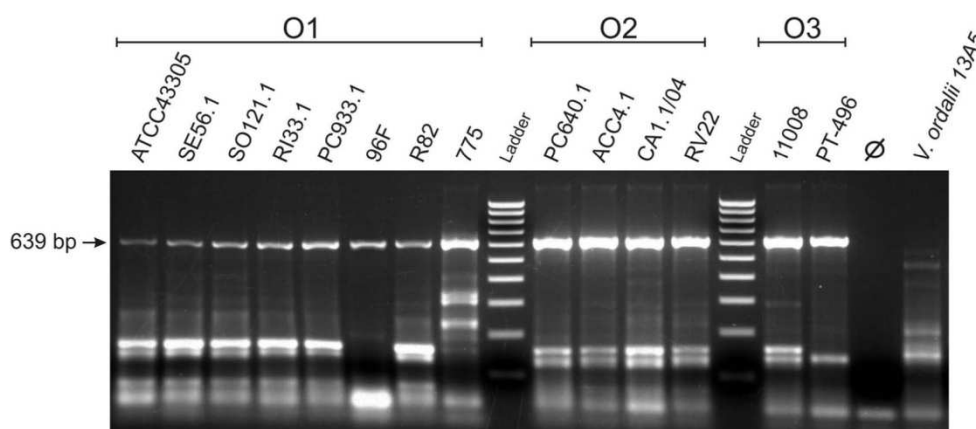


FIG. 5. Detection of *fvtA* transcripts using RT-PCR. Fourteen *V. anguillarum* strains belonging to serotypes O1, O2, and O3 were analyzed (strain designations are indicated at top). The arrow on the left indicates the expected size of the *fvtA* RT-PCR product. The same RT-PCR carried out with *Vibrio ordalii* 13A5 was negative. Negative controls using DNase-treated RNA as the PCR template to rule out the presence of contaminating DNA were negative in all cases (an example is the control for RV22 [∅]). The ladder is composed of 10 fragments whose sizes range from 100 to 1,000 bp in 100-bp increments.

$\Delta fvtA$ and $\Delta orf13$ mutant strains, which implies that an unknown *V. anguillarum* receptor is able to transport enterobactin, a catechol siderophore whose functional relationship with vanchrobactin has been suggested previously (10, 20). It is frequently found that bacteria utilize exogenous siderophores since in this way they can pirate siderophores of their competitors and escape the bacteriostatic effects caused by these compounds (33). *E. coli* K-12 possesses at least six OM receptors that enable acquisition of eight different iron-chelator complexes, four of which are exogenously produced (2).

However, amonabactin, aerobactin, and anguibactin (a siderophore produced by *V. anguillarum* strains that carry pJM1 or pJM1-like plasmids) are three siderophores that cannot be utilized by *V. anguillarum* RV22. These results are in agreement with previous observations that plasmidless *V. anguillarum* strains cannot utilize anguibactin and do not express FatA, the anguibactin OM receptor (10, 20). Surprisingly, the presence of gene sequences with high levels of similarity to *fatA* and *fatD* (the receptor and ABC transporter genes of the anguibactin system, respectively) (1, 40) was recently reported in strains that contained either no plasmids or only small plasmids (5). Interestingly, we found that the chromosome of *V. anguillarum* RV22 actually contains *fatDCBA* homologues, as well as other genes present in the pJM1 plasmid, although it has a different gene arrangement (Fig. 4). However, the expression of *fatDCBA* is likely abolished, since insertion of ca. 9 kb of transposases disrupts the first gene of the operon, from which transcription of the four genes is driven. This finding is supported by the negative results in all attempts to detect *fatDCBA* transcripts by RT-PCR (data not shown). Furthermore, Naka et al. (28) detected FatA in the OM of strain RV22 only when it was transformed with a pJM1 plasmid. These findings not only demonstrate that the FatA-mediated anguibactin acquisition system is inappropriate for use in the Trojan horse strategy but also bring up interesting questions

about the origin and evolution of the vanchrobactin and anguibactin systems in *V. anguillarum*.

Vanchrobactin biosynthesis and transport genes are ubiquitous in *V. anguillarum* strains. It is not known if the vanchrobactin transport system is widely distributed in *V. anguillarum* strains. This question is of special interest because in order for the vanchrobactin analogues to be employed in the development of novel antimicrobials, their route of entry into the cell should be widespread in the species. PCR and Southern hybridization were used to assay the presence of the *fvtA*, *orf13*, and *vab* genes in a collection of 33 strains that represented the 10 main serotypes (serotypes O1 to O10) of *V. anguillarum*. The results indicate that all strains contain *fvtA* and *orf13* and that *vabB* is absent from some serotype O3 isolates (strains PT-4933, 11008, and ATCC 4330) (Table 3). Thus, all *V. anguillarum* strains seem to harbor a copy of the *fvtA* gene.

It appears from the present results that the vanchrobactin biosynthesis and transport gene system is ubiquitous in *V. anguillarum* strains. A question that arises is why not all of these strains produce vanchrobactin. The presence of the pJM1 plasmid, containing most genes necessary for anguibactin production and transport, has been associated with the lack of production of vanchrobactin. Naka et al. (28) showed that *vabF* in the *V. anguillarum* 775 (a strain carrying pJM1) chromosome is disrupted by the insertion sequence (IS) RS1. In the present study we detected the presence of RS1, an insertion that abolishes vanchrobactin biosynthesis, in *vabF* in all strains that carry pJM1 or pJM1-like plasmids (Table 3). RS1 encodes a transposase that is 100% identical to the RS1 (*orf21*) transposase originally described for the pJM1 plasmid (11), suggesting that this IS could have transposed from the plasmid to the chromosome. The genes encoding the proteins of the anguibactin-iron uptake system on pJM1-like plasmids are flanked by ISs ISV-A1 and ISV-A2 in a transposon-like struc-

ture, and transposition of ISV-A2 at a frequency of 7.2×10^{-6} was recently demonstrated (21).

The vanchrobactin system was proposed to be the ancestral siderophore in *V. anguillarum* (28), a hypothesis reinforced by our finding that vanchrobactin biosynthesis genes are present in all strains of *V. anguillarum* tested, as well as by the dependence of anguibactin biosynthesis on some vanchrobactin biosynthesis elements that complement pJM1 pseudogenes (1). *fvtA* is cotranscribed with *vabD* as a polycistronic mRNA, and we know that these genes are essential for vanchrobactin transport and biosynthesis, respectively (3). The sequence of *fvtA* homologues in anguibactin-producing strains is 100% identical to the sequence of RV22 *fvtA*. In addition, *V. anguillarum* 775 (an anguibactin-producing strain) can also use vanchrobactin (37), and in this strain *vabD* is a functional gene (28). These two observations clearly suggest that *fvtA* (from which promoter *vabD* gene transcription is driven) is expressed not only in vanchrobactin-producing strains but also in anguibactin-producing strains. To verify this hypothesis, we used RT-PCR to detect the presence of *fvtA* transcripts in RNA samples from *V. anguillarum* strains grown under low-iron conditions. Figure 5 shows the expression of *fvtA* in 14 selected strains representing the three most relevant pathogenic serotypes (serotypes O1, O2, and O3) (Table 3). Sequencing of the PCR amplicons confirmed that the 639-bp band detected corresponded to *fvtA* (data not shown).

Therefore, when siderophore uptake machinery is used to internalize siderophore analogues coupled to antimicrobial agents against *V. anguillarum*, the strategy of choice should be to use the vanchrobactin entry pathway, since it is the only pathway present in all strains, especially strains of the three main pathogenic serotypes.

Conclusions. In this work we have determined that FvtA is the OM transporter for vanchrobactin and its analogues in *V. anguillarum*. In addition, we have demonstrated that *fvtA* is present in both vanchrobactin- and anguibactin-producing strains, where it is a functional gene. The vanchrobactin analogue DHBA-Orn-Ser, of special interest for attaching antimicrobial ligands, is optimally transported by FvtA. FvtA would be an optimum route of entry for new antibacterial compounds using the Trojan horse strategy, due to its ubiquity in this species and to the wide range of vanchrobactin analogues transported.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Carlos Jiménez from the University of A Coruña (Spain) for supplying purified vanchrobactin and vanchrobactin analogues used in this work.

This work was supported by grant AGL2006-00697 from the Ministry of Science and Innovation of Spain (cofunded by the FEDER Programme from the European Union) to M.L.L. M.B. acknowledges the Ministry of Science and Innovation of Spain for a predoctoral FPI fellowship.

REFERENCES

- Alice, A. F., C. S. Lopez, and J. H. Crosa. 2005. Plasmid- and chromosome-encoded redundant and specific functions are involved in biosynthesis of the siderophore anguibactin in *Vibrio anguillarum* 775: a case of chance and necessity? *J. Bacteriol.* **187**:2209–2214.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:215–237.
- Balado, M., C. R. Osorio, and M. L. Lemos. 2008. Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* **154**:1400–1413.
- Balado, M., C. R. Osorio, and M. L. Lemos. 2006. A gene cluster involved in the biosynthesis of vanchrobactin, a chromosome-encoded siderophore produced by *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* **152**:3517–3528.
- Bay, L., J. L. Larsen, and J. J. Leisner. 2007. Distribution of three genes involved in the pJM1 iron-sequestering system in various *Vibrio anguillarum* serogroups. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**:85–92.
- Braun, V., K. Hantke, and W. Koster. 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met. Ions Biol. Syst.* **35**:67–145.
- Brochu, A., N. Brochu, T. I. Nicas, T. R. Parr, Jr., A. A. Minnick, Jr., E. K. Dolence, J. A. McKee, M. J. Miller, M. C. Lavoie, and F. Malouin. 1992. Modes of action and inhibitory activities of new siderophore-beta-lactam conjugates that use specific iron uptake pathways for entry into bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2166–2175.
- Budzikiewicz, H. 2001. Siderophore-antibiotic conjugates used as Trojan horses against *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**:73–82.
- Buynak, J. D. 2004. The discovery and development of modified penicillin- and cephalosporin-derived beta-lactamase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **11**:1951–1964.
- Conchas, R. F., M. L. Lemos, J. L. Barja, and A. E. Toranzo. 1991. Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2956–2962.
- Di Lorenzo, M., M. Stork, M. E. Tolmasky, L. A. Actis, D. Farrell, T. J. Welch, L. M. Crosa, A. M. Wertheimer, Q. Chen, P. Salinas, L. Waldbeser, and J. H. Crosa. 2003. Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J. Bacteriol.* **185**:5822–5830.
- Ferguson, A. D., and J. Deisenhofer. 2004. Metal import through microbial membranes. *Cell* **116**:15–24.
- Funahashi, T., K. Moriya, S. Uemura, S. Miyoshi, S. Shinoda, S. Narimatsu, and S. Yamamoto. 2002. Identification and characterization of *pvuA*, a gene encoding the ferric vibrioferrin receptor protein in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **184**:936–946.
- Goldberg, M. B., S. A. Boyko, J. R. Bitterton, J. A. Stoeber, S. M. Payne, and S. B. Calderwood. 1992. Characterization of a *Vibrio cholerae* virulence factor homologous to the family of TonB-dependent proteins. *Mol. Microbiol.* **6**:2407–2418.
- Gudmundsdottir, A., P. E. Bell, M. D. Lundrigan, C. Bradbeer, and R. J. Kadner. 1989. Point mutations in a conserved region (TonB box) of *Escherichia coli* outer membrane protein BtuB affect vitamin B12 transport. *J. Bacteriol.* **171**:6526–6533.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**:95–98.
- Hantke, K. 1990. Dihydroxybenzoylserine: a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**:5–8.
- Hennard, C., Q. C. Truong, J. F. Desnottes, J. M. Paris, N. J. Moreau, and M. A. Abdallah. 2001. Synthesis and activities of pyoverdine-quinolone adducts: a prospective approach to a specific therapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Chem.* **44**:2139–2151.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557–6567.
- Lemos, M. L., P. Salinas, A. E. Toranzo, J. L. Barja, and J. H. Crosa. 1988. Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **170**:1920–1925.
- Liang, N., H. Wu, J. Ye, P. Xu, Y. Zhang, and H. Zhang. 2007. Molecular cloning of an insertion sequence-like element from *Vibrio anguillarum* and its functional identification in *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* **29**:1951–1957.
- Lundrigan, M. D., and R. J. Kadner. 1986. Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. *J. Biol. Chem.* **261**:10797–10801.
- Mazoy, R., C. R. Osorio, A. E. Toranzo, and M. L. Lemos. 2003. Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Arch. Microbiol.* **179**:329–338.
- Miethke, M., and M. A. Marahiel. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:413–451.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Miller, M. J., H. Zhu, Y. Xu, C. Wu, A. J. Walz, A. Vergne, J. M. Roosenberg, G. Moraski, A. A. Minnick, J. McKee-Dolence, J. Hu, K. Fennell, E. Kurt Dolence, L. Dong, S. Franzblau, F. Malouin, and U. Mollmann. 2009. Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. *Biomaterials* **22**:61–75.
- Mouriño, S., C. R. Osorio, and M. L. Lemos. 2004. Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **186**:6159–6167.
- Naka, H., C. S. Lopez, and J. H. Crosa. 2008. Reactivation of the vanchro-

- bactin siderophore system of *Vibrio anguillarum* by removal of a chromosomal insertion sequence originated in plasmid pJM1 encoding the anguibactin siderophore system. *Environ. Microbiol.* **10**:265–277.
29. Nau, C. D., and J. Konisky. 1989. Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequences of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J. Bacteriol.* **171**:1041–1047.
 30. Parales, R. E., and C. S. Harwood. 1993. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram-bacteria. *Gene* **1**:23–30.
 31. Persmark, M., D. Expert, and J. B. Neilands. 1992. Ferric iron uptake in *Erwinia chrysanthemi* mediated by chrysobactin and related catechol-type compounds. *J. Bacteriol.* **174**:4783–4789.
 32. Rabsch, W., U. Methner, W. Voigt, H. Tschape, R. Reissbrodt, and P. H. Williams. 2003. Role of receptor proteins for enterobactin and 2,3-dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **71**:6953–6961.
 33. Ratledge, C., and L. G. Dover. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:881–941.
 34. Roosenberg, J. M., II, Y. M. Lin, Y. Lu, and M. J. Miller. 2000. Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents. *Curr. Med. Chem.* **7**:159–197.
 35. Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**:47–56.
 36. Soengas, R. G., C. Anta, A. Espada, V. Paz, I. R. Ares, M. Balado, J. Rodriguez, M. L. Lemos, and C. Jimenez. 2006. Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Tetrahedron Lett.* **47**:7113–7116.
 37. Soengas, R. G., M. Larrosa, M. Balado, J. Rodriguez, M. L. Lemos, and C. Jimenez. 2008. Synthesis and biological activity of analogues of vanchrobactin, a siderophore from *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Org. Biomol. Chem.* **6**:1278–1287.
 38. Stojiljkovic, L., V. Kumar, and N. Srinivasan. 1999. Non-iron metalloporphyrins: potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **31**:429–442.
 39. Stork, M., M. Di Lorenzo, S. Mouriao, C. R. Osorio, M. L. Lemos, and J. H. Crosa. 2004. Two *tonB* systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence. *Infect. Immun.* **72**:7326–7329.
 40. Stork, M., M. Di Lorenzo, T. J. Welch, L. M. Crosa, and J. H. Crosa. 2002. Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* **48**:222–228.
 41. Toranzo, A. E., and J. L. Barja. 1990. A review of the taxonomy and sero-epizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.* **9**:73–82.
 42. Toranzo, A. E., J. L. Barja, S. A. Potter, R. R. Colwell, F. M. Hetrick, and J. H. Crosa. 1983. Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infect. Immun.* **39**:1220–1227.
 43. Toranzo, A. E., Y. Santos, and J. L. Barja. 1997. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. *Dev. Biol. Stand.* **90**:93–105.
 44. Wang, R. F., and S. R. Kushner. 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**:195–199.
 45. Wolf, M. K., and J. H. Crosa. 1986. Evidence for the role of a siderophore in promoting *Vibrio anguillarum* infections. *J. Gen. Microbiol.* **132**:2949–2952.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Tetrahedron
Letters

Tetrahedron Letters 47 (2006) 7113–7116

Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2

Raquel G. Soengas,^a Cristina Anta,^b Alfonso Espada,^b Vanessa Paz,^a Isabel R. Ares,^c Miguel Balado,^c Jaime Rodríguez,^a Manuel L. Lemos^c and Carlos Jiménez^{a,*}

^aDepartamento de Química Fundamental, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, A Coruña E-15071, Spain

^bAnalytical Technologies DCR&T Alcobendas, Lilly S.A., Avda. de la Industria 30, E-28108 Alcobendas/Madrid, Spain

^cDepartamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela E-15782, Spain

Received 20 June 2006; revised 6 July 2006; accepted 10 July 2006

Abstract—Vanchrobactin, a new catechol-type siderophore produced by cells of the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2, has been isolated from the supernatants of iron-deficient cultures. Its structure was characterized from spectral data and established as *N*-[*N*′-(2,3-dihydroxybenzoyl)-arginyl]-serine.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Iron acquisition is an indispensable process for most living organisms because it is required as a cofactor for enzymes involved in general metabolism, DNA replication, as well as in the electron transport chain.¹ In spite of its abundance (5% of the earth crust), the availability of iron is dramatically limited by the very high insolubility of Fe³⁺ at physiological pH. Since there is virtually no free iron available for bacterial growth,² bacterial pathogens have evolved a number of mechanisms to overcome this iron restriction. The most common ‘biomachinery’ involves the synthesis and secretion of low molecular weight (300–2000 Da) high-affinity chelators to sequester Fe³⁺, termed siderophores.³ These molecules, generally excreted into the culture medium, are able to strongly chelate in a specific manner to solubilize and deliver Fe³⁺ into the cells. This process occurs via specific cell surface receptors using an ATP-dependent high-affinity transport system.⁴

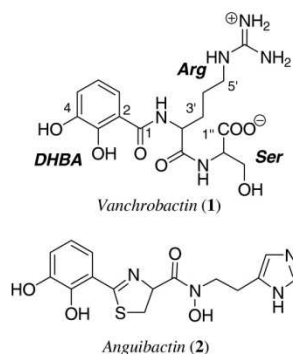
The bacterial fish pathogen *Vibrio anguillarum* is the causative agent of vibriosis, an extremely fatal hemorrhagic septicemia. This disease affects marine and freshwater fish species throughout the world that results

in considerable economic losses in aquaculture farming worldwide.⁵ Although there are more than 20 recognized serotypes,⁶ those named O1 and O2 are the main ones implicated in the infections.⁷ It is known that the ability to scavenge iron through the utilization of siderophores is a key factor in the virulence of this fish pathogen.⁸

At least two different siderophore-mediated systems have been described so far in *V. anguillarum*. Most pathogenic strains belonging to serotype O1 possess a system that is encoded by the 65-kb plasmid pJM1, which harbors genes for the synthesis and utilization of the catecholate-type siderophore anguibactin (2).^{9,10} However, serotype O2 strains and some plasmidless serotype O1 strains produce a siderophore,^{11a} given the trivial name of vanchrobactin (1), encoded by chromosomal genes and that is biologically unrelated to the anguibactin-mediated system.¹¹ The structure of vanchrobactin is still not determined, since attempts to reveal its complete structure have been hindered by problems associated with its purification in sufficient quantities and decomposition during isolation.

In this letter, we wish to present the isolation, and the planar structural characterization of the mentioned siderophore vanchrobactin (1).

* Corresponding author. Tel.: +34 981 167000; fax: +34 981 167065; e-mail addresses: jaimer@udc.es; carlosjg@udc.es



This compound was isolated from iron-deficient cultures in CM9 medium of *V. anguillarum* serotype O2 strain RV22 by a bioguided fractionation using several assays. Siderophore activity of fractions was tested using plate assays (CM9 medium supplemented with the iron chelator 2,2'-dipyridyl 100 μ M) with strain RV22 as indicator. In addition, siderophore activity was measured by the CAS assay,¹² along with the Arnow test¹³ that was used for catechol determination.

The cell-free culture supernatants (18 L) were loaded onto a XAD-7 resin, and then, after washing with distilled water, the siderophore was eluted with a methanol/water (1:1) mixture followed by methanol. The active fractions were first dissolved in water and then extracted with CH_2Cl_2 and *n*-BuOH. The bioactive aqueous fraction was evaporated under reduced pressure and then chromatographed on a Sephadex LH-20 column in 10% MeOH/ H_2O . Finally, repeated RP-HPLC purification of the active fraction on Atlantis C18 (100 \times 4.6 mm, 5 μ m) column using a 10 min 0–50% gradient of acetonitrile in water with 0.05% TFA gave 0.8 mg (retention time 5 min, flow 1 mL/min) of compound **1**.

Compound **1** was obtained as an amorphous solid with an $[\alpha]_D$ of -13.6 (c 25 $\times 10^{-3}$, MeOH). The strong IR band at 1679 cm^{-1} was characteristic of an amide C=O stretch, while the broadband near 3349 cm^{-1} was indicative of the presence of O–H stretching and an hydrogen bonded amide NH.¹⁴ The prominent pseudomolecular ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 398 along with $[\text{M}+\text{Na}]^+$ at m/z 420 in the (+)-ESIMS of **1** and the corresponding $[\text{M}-\text{H}]^-$ at m/z 396 in the (–)-ESIMS were consistent with a molecular weight of 397 for vanchrobactin. The HRESIMS of the pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion at m/z 398.1658 was in good agreement with that expected for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_7$ (calculated 398.1670). The ^{13}C NMR and DEPT spectra of **1** in D_2O displayed 16 distinct resonances including three carbonyl groups, one sp^2 quaternary carbon at 157.24 characteristic of a guanidine moiety, six aromatic carbons (three CH and three quaternary), two methines, and four methylenes. The presence of a catechol moiety in **1** was easily deduced from the proton and carbon chemical shifts, and the coupling of the three proton aromatic signals. The combined use of ^1H – ^1H DQF-

COSY and edited gHSQC experiments measured in a cryoprobe, allowed the assignment of three spin systems, which clearly suggested the presence of a dipeptide composed by serine and arginine aminoacid residues linked to the 2,3-dihydroxybenzoyl moiety (DHBA). The downfield shifted of the arginine α -proton at 4.67 ppm suggested that DHBA was attached to the free amino group of the arginine. This was confirmed by the long range C–H correlation observed in the gHMBC spectrum between the carbonyl carbon at 170.55 ppm of the DHBA moiety and the H2' proton of the arginine residue which showed also HMBC correlations to C1' and C3'. Further long range C–H correlations observed in the gHMBC allowed us to assemble the three fragments (Fig. 1). The absolute configurations of the aminoacid residues have not been determined.

On the basis of these data, the structure of vanchrobactin (**1**) was thus established as *N*-[*N'*-(2,3-dihydroxybenzoyl)-arginyl]-serine.

Very few containing-arginine siderophores were reported so far.¹⁵ Since it is very unlikely that arginine serves as metal-binding ligand at pH 7–8 because its pK_a is too high, it was postulated that it plays a role in molecular recognition with the outer membrane receptors.¹⁶

Interestingly, our recent work,¹⁷ on the identification and characterization of the genes and enzymes involved in the biosynthesis of vanchrobactin in strain RV22, confirms the structure reported here. The analysis of the adenylation domains of enzymes VacE and VacF, two non ribosomal peptide synthetases, as well as the mutation of the respective genes, confirm that arginine and serine are in fact the aminoacids incorporated in vanchrobactin. The assembly order of the three components (DHBA, arginine, serine) was also confirmed by the module arrangement predicted by the enzymes aminoacid sequences. On the other hand, the identification of other genes that codify for enzymes involved in DHBA biosynthesis clearly demonstrates that both, DHBA and vanchrobactin, are products of the iron metabolism of *V. anguillarum* serotype O2 strains.

According to the structure reported here, vanchrobactin (**1**) shares several structural similarities with anguibactin (**2**), the siderophore typically produced by strains of *V. anguillarum* serotype O1. Both are linear molecules

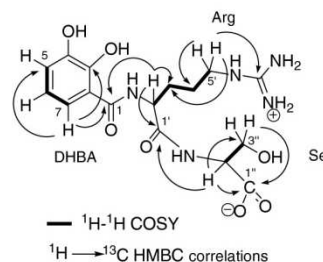


Figure 1. Selected COSY and HMBC correlations observed for **1**.

Table 1. ^{13}C NMR (125 MHz), ^1H NMR (500 MHz), and HMBC spectral data of vanchrobactin (**1**) in D_2O

Position	δ_{C}	DEPT	δ_{H} mult (J in Hz)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
<i>DHBA</i>				
C1	170.55	C		
C2	117.83	C		
C3	146.87	C		
C4	145.08	C		
C5	120.45	CH	6.83 d (6.9)	C: 3,4,7
C6	120.23	CH	6.65 t (6.9)	C: 2,4
C7	120.18	CH	7.01 d (6.9)	C: 1,3,5
<i>Arginine</i>				
C1'	174.23	C		
C2'	54.08	CH	4.67 dd (7.4, 4.9)	C: 1(DHBA), 1', 3'(Arg)
C3	28.86	CH_2	2.33 m/2.22 m	
C4'	24.82	CH_2	2.08 m	
C5'	40.98	CH_2	3.41 t (5.9)	C: 3',4',6'(Arg)
C6'	157.24	C		
<i>Serine</i>				
C1''	174.57	C		
C2''	56.14	CH	4.52 br t (4.4)	C: 1'',3''(Ser), 1'(Arg)
C3''	61.79	CH_2	4.02 dd (4.4 and 10.5)/3.97 dd (3.3 and 10.5)	

derived from dipeptide derivatives bound to 2,3-dihydroxybenzoic acid. However, the structure of vanchrobactin differs from that of anguibactin by the lack of the hydroxamate functionality and by the amino acid residue precursors: arginine and serine for vanchrobactin instead of cysteine and decarboxylatehistidine residues for anguibactin. This suggests that both siderophores may have different evolutive origins.

It has been reported,^{11a} that functional and genetic similarities exist between vanchrobactin and enterobactin (a triscatechol derivative of a cyclic triserine lactone)¹⁸ produced by *Escherichia coli* and other Enterobacteria, some of them being human pathogens. The results reported here corroborate these previous observations since enterobactin, like vanchrobactin, is made from DHBA and serine (see Table 1).¹⁹

The observation that a fish pathogen synthesizes a siderophore chemically related to that produced by human pathogens, opens new interesting perspectives to study the evolution of bacterial pathogens and their metabolic functions. From a practical point of view, and since siderophores are critical for growth and virulence of the producer pathogens, the knowledge of its structure and biosynthesis pathways can be useful for the development of a novel class of antimicrobials.²⁰ In this regard, the determination of vanchrobactin structure, together with the already known anguibactin, may lead to new strategies for either, interfering with the iron-acquisition mechanisms of *V. anguillarum*, or be used as 'trojan horses' for development of new rationally designed anti-bacterial agents against vibriosis.

Acknowledgments

This work was financially supported by grants from CICYT (MAR99-0287 and CQT2005-00793) and Xunta de Galicia (PGIDIT05RMA10302PR) to C.J. and J.R.,

and grants AGL2003-00086 from the Ministry of Science and Technology of Spain (cofunded by FEDER), PGIDIT04PXIC23501PN and PGIDIT04RMA261014-PR-3 from Xunta de Galicia to M.L.L. R.G.S. thanks Programa Parga Pondal.

References and notes

- Ratledge, C.; Dover, L. G. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54*, 881–941.
- Wandersman, C.; Delepelaire, P. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 611–647.
- Lankford, C. E. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **1973**, *2*, 273–331.
- (a) Pattus, F.; Abdallah, M. A. *J. Chin. Chem. Soc.* **2000**, *47*, 1–20; (b) Crosa, J. H.; Walsh, C. T. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 223–249.
- Toranzo, A. E.; Barja, J. L. *Dis. Aquat. Organ.* **1990**, *9*, 73–82.
- Pedersen, K.; Grisez, L.; van Houdt, R.; Tiainen, T.; Ollevier, F.; Larsen, J. L. *Curr. Microbiol.* **1999**, *38*, 183–189.
- Toranzo, A. E.; Santos, Y.; Barja, J. L. *Dev. Biol. Stand.* **1997**, *90*, 93–105.
- Wolf, M. K.; Crosa, J. H. *J. Gen. Microbiol.* **1986**, *132*, 2949–2952.
- Stork, M.; Di Lorenzo, M.; Welch, T. J.; Crosa, L. M.; Crosa, J. H. *Plasmid* **2002**, *48*, 222–228.
- Jalal, M. A. F.; Hossain, M. B.; Van Der Helm, D.; Sanders-Loehr, J.; Actis, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 292–296.
- (a) Lemos, M. L.; Salinas, P.; Toranzo, A. E.; Barja, J. L.; Crosa, J. H. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 1920–1925; (b) Conchas, R. F.; Lemos, M. L.; Barja, J. L.; Toranzo, A. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 2956–2962.
- Schwyn, U. B.; Neilands, J. B. *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 47–56.
- Arnold, L. E. *J. Biol. Chem.* **1937**, *118*, 531–537.
- UV (MeOH) λ_{max} 249 (lg ϵ 3.81), 314 (3.32) nm; IR (neat) ν_{max} : 3349, 2925, 1679, 1209, 1138, 843, 803, 724 cm^{-1} .
- Some examples: (a) Reid, R. T.; Live, D. H.; Faulkner, D. J.; Butler, A. *Nature* **1993**, *36*, 455–458; (b) Demange, P.;

- Wendenbaum, S.; Linget, C.; Mertz, C.; Manh, T. C.; Dell, A.; Abdallah, M. A. *Biol. Met.* **1990**, 3, 155–170.
16. Reid, R. T.; Butler, A. *Limnol. Oceanogr.* **1991**, 36, 1783–1792.
17. Balado, M.; Osorio, C. R.; Lemos, M. L., submitted for publication.
18. Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 3584–3588.
19. Walsh, C. T.; Liu, J.; Rusnak, F.; Sakaitani, M. *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1105–1129.
20. Somu, R. V.; Boshoff, H.; Qiao, C.; Bennett, E. M.; Barry, C. E., III; Aldrich, C. C. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 31–34.

Synthesis and biological activity of analogues of vanchrobactin, a siderophore from *Vibrio anguillarum* serotype O2

Raquel G. Soengas,^a Marta Larrosa,^a Miguel Balado,^b Jaime Rodríguez,^{*a} Manuel L. Lemos^b and Carlos Jiménez^{*a}

Received 21st December 2007, Accepted 11th February 2008

First published as an Advance Article on the web 29th February 2008

DOI: 10.1039/b719713f

Several analogues of vanchrobactin, a catechol siderophore isolated from the bacterial fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2 strain RV22, have been synthesized. The biological evaluation of these novel compounds showed that most of them are active as siderophores, as determined by growth promotion assays using the producer strain, as well as *V. anguillarum* serotype O1, *Salmonella enterica*, and *Erwinia chrysanthemi*. These compounds also gave a positive chrome azurol-S (CAS) test. On the basis of these results, we were able to deduce some structure–activity relationships. Furthermore, we found an analogue with siderophore activity that has appropriate functionality (an amino group) for use as an antibiotic vector to be employed in a “Trojan horse strategy”.

Introduction

All living creatures require iron in their cellular reactions. Since iron is unavailable for uptake due to the low solubility of Fe³⁺ at the neutral to alkaline pH conditions in soil or in aqueous media, organisms have developed different mechanisms to acquire it from the environment. During infection, most bacteria encounter within the host an iron-limited environment: higher eukaryotes contain substantial amounts of this metal but it is tightly associated with transport and storage proteins and not freely available for pathogens. Consequently, the level of free iron in biological fluids is usually estimated to be only 10^{−18} M. In an attempt to cope with this insolubility, many microorganisms have evolved specific iron uptake mechanisms. One of these mechanisms involves the production of iron chelators named siderophores, which are low molecular weight (300 to 2000 Da) ferric-specific ligands. These molecules, which are generally excreted into the culture medium, are able to strongly chelate Fe³⁺ in a specific manner to solubilize it and deliver it to the cells. In bacteria, the siderophore–iron(III) complex is recognized and transported by specific outer membrane receptors. The uptake process is thermodynamically driven from the cytoplasm through the TonB system that transduces the necessary energy from the cytosol to the outer membrane receptor. Natural siderophores are usually not very selective and many bacteria and fungi can utilize exogenous siderophores made by different microorganisms.¹

Vibrio anguillarum is the causative agent of vibriosis in fish, a fatal hemorrhagic septicaemia. This disease affects marine and freshwater fish species and results in considerable economic losses in aquaculture farming worldwide.² There are more than twenty

recognized serotypes, but those denoted O1 and O2 are the main ones implicated in vibriosis outbreaks.³ Although the virulence mechanisms of *V. anguillarum* are not fully understood, it is known that the ability to scavenge iron through the utilization of siderophores contributes significantly to the virulence of this bacterium.⁴ The best characterized siderophore produced by *V. anguillarum* is anguibactin, which was isolated from a strain belonging to serotype O1. In the course of our studies into siderophores from marine microorganisms, a novel siderophore, vanchrobactin (**1c**), was isolated (and characterized) from iron-deficient cultures of *V. anguillarum* serotype O2 strain RV22.⁵ The stereochemistry of **1c** was elucidated by chiral capillary electrophoresis analysis and total synthesis, showing the compound to be *N*-[*N'*-(2,3-dihydroxybenzoyl)-D-arginyl]-L-serine.⁶ The increasing antibiotic-mediated selective pressure has led to the emergence of multiresistant strains in many bacterial pathogens, and fish pathogens are no exception. Thus, more novel and efficient antimicrobial drugs are necessary to treat these emerging infections that are resistant to common antibiotics. One way as increase the efficiency of antimicrobials against bacterial infections could be the “Trojan horse strategy”, where antimicrobial drugs are coupled to siderophores and transported across the bacterial membranes through the iron uptake pathways.⁷ Such an approach has already been developed and has given promising results with the pyoverdine-mediated iron uptake system⁸ and conjugated siderophore/β-lactamase inhibitors.⁹ Our working hypothesis was that vanchrobactin from *V. anguillarum* could be a very interesting candidate for such a prodrug strategy aimed at the development of new antimicrobials against vibriosis and probably against other related infectious diseases.

Previous examples of natural and synthetic catecholate-type compounds based on amino acids or peptides, such as chrysobactin,¹⁰ were shown to be active as siderophores. Although those studies allowed some structure–activity correlations to be deduced,¹¹ very few systematic investigations into this type of compound have been carried out.¹² We report here the synthesis of several analogues of vanchrobactin (**1c**) using the efficient, simple and versatile synthesis that we reported recently.⁵ The aim was

^aDepartamento de Química Fundamental, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira, 15071, A Coruña, Spain. E-mail: carlosjg@udc.es, jaimer@udc.es; Fax: +34 9811 67065; Tel: +34 9811 67065

^bDepartamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, E-15782, Spain. E-mail: mlemos@usc.es; Fax: +34 9815 47165; Tel: +34 9815 63100

to evaluate their siderophore activity and to study the structure-siderophore activity relationships. Moreover, in view of its possible use as an antibiotic vector, another goal was to obtain an analogue with siderophore activity for *V. anguillarum* that incorporated appropriate functionality (such as an amino group) for use as an anchor to be attached directly (or *via* spacers) to other biologically active agents, like antibiotics, for the design of iron transport-mediated drug delivery.

Results and discussion

In order to compare the influence of the configuration of the asymmetric centres, the amino acid sequence and the presence of the guanidine moiety on the siderophore activity of vancrobactin analogues, compounds **1–11** were prepared using a strategy similar to that employed for the total synthesis of vancrobactin.⁶

Synthesis of *N*-(2,3-dihydroxybenzoyl)-arginyl/ornithinyl derivatives

Firstly, we studied the preparation of the analogues with the DHBA directly linked to ornithine or arginine residues (Scheme 1), *i.e.*, analogues **1**, **3**, **4** and **6**.

*N*⁶-Cbz-D-ornithine-OMe, prepared from D-ornithine,¹³ was coupled with 2,3-dibenzoyloxybenzoic acid (DHBA)¹⁴ using TBTU as the coupling agent to give the corresponding ester in very good yield. The resulting ester was hydrolyzed with barium hydroxide, giving the acid **2b** in a 78% yield.¹⁵ The same sequence was car-

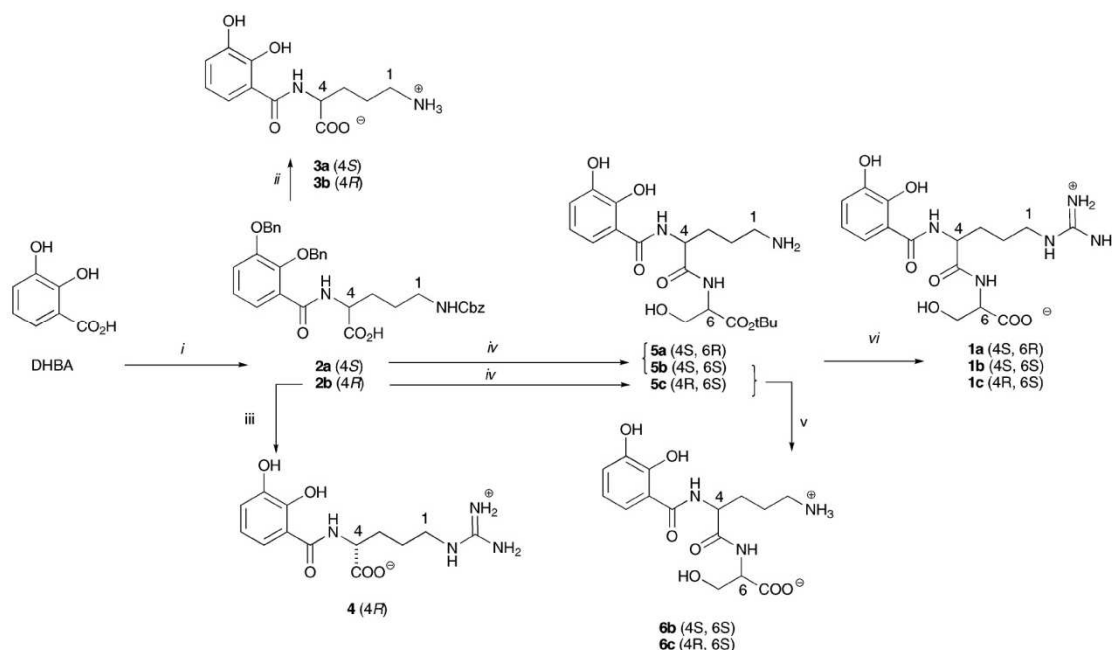
ried out using *N*⁶-Cbz-L-ornithine-OMe, which was prepared by esterification of the commercially available *N*⁶-Cbz-L-ornithine,¹⁶ to afford the enantiomeric acid **2a** (79% yield). Both acids were submitted to catalytic hydrogenation, giving rise to analogues **3a** (DHBA-L-Orn) and **3b** (DHBA-D-Orn) in quantitative yield. Alternatively, protection of the acid **2b** as the *tert*-butyl ester, catalytic hydrogenation followed by the introduction of the guanidine function by reaction with 1,3-di-Boc-2-(trifluoromethanesulfonyl) guanidine,¹⁷ and acidic hydrolysis afforded analogue **4** (DHBA-D-Arg) in 35% yield.

Both D- and L-serine *tert*-butyl esters were coupled with compound **2a** using TBTU, after removal of the benzyl and Cbz protecting groups, to afford compounds **5a** (28% yield) and **5b** (29% yield), respectively. Following the same procedure, L-serine *tert*-butyl ester was coupled with **2b** to give compound **5c** in 82% yield. Derivatives **5b** and **5c** were submitted to acidic hydrolysis of the *tert*-butyl ester to afford analogues **6b** (DHBA-L-Orn-L-Ser) and **6c** (DHBA-D-Orn-L-Ser), respectively, in quantitative yields.

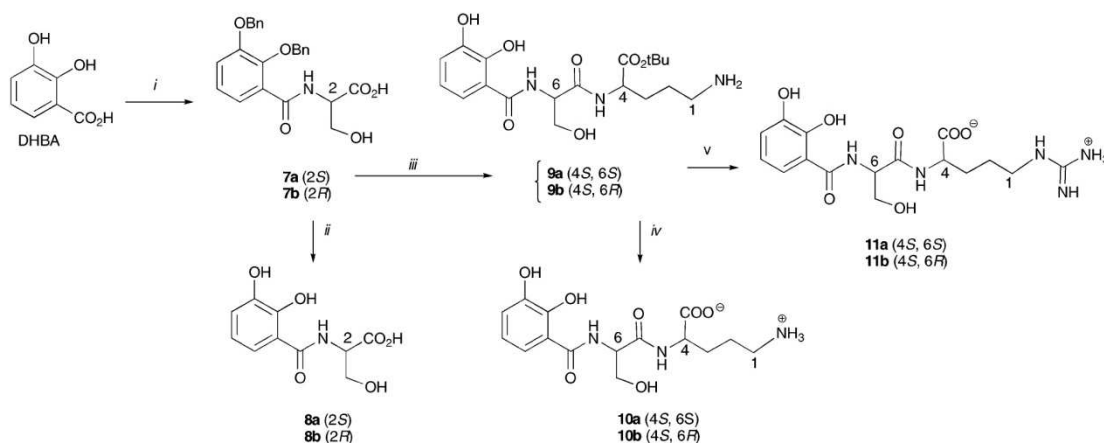
Finally, guanidinylation of **5a**, **5b** and **5c** as before followed by acidic hydrolysis gave **1a** (DHBA-L-Arg-D-Ser), **1b** (DHBA-L-Arg-L-Ser) and **1c** (DHBA-D-Arg-L-Ser, vancrobactin) in 73%, 62% and 61% yield, respectively.

Synthesis of 2,3-dihydroxybenzoyl-serinyl derivatives

In an effort to evaluate the influence of the amino acid sequence on the siderophore activity, we designed the synthesis of



Scheme 1 Reagents and conditions: i: 1. SOCl₂/MeOH (89%); 2. BnBr/K₂CO₃ (99%); 3. Ba(OH)₂, THF, H₂O, 50 °C, 12 h, quant.; 4. *N*⁶-Cbz-L-ornithine-OMe or *N*⁶-Cbz-D-ornithine-OMe, TBTU, Et₃N, DMF, rt, 16 h (78% and 79%, respectively); 5. Ba(OH)₂, THF, H₂O, 50 °C, 16 h, quant.; ii: H₂, Pd/C, MeOH, rt, 3 h, quant.; iii: 1. *t*-BuOAc, HClO₄; 2. H₂, Pd/C, MeOH, rt, 3 h, (48%); 3. (NHBoc)₂NTf, Et₃N, CHCl₃, rt, 1 h (73%); 4. TFA/DCM 3:7, rt, 16 h, quant.; iv: 1. L-Ser-O^tBu or D-Ser-O^tBu, TBTU, Et₃N, DMF, rt, 16 h; 2. H₂, Pd/C, MeOH, rt, 3 h (28%, 29% and 82%); v: TFA/DCM 3:7, rt, 16 h, quant.; vi: 1. (NHBoc)₂NTf, Et₃N, CHCl₃, rt, 1 h (73%, 62% and 61%); 2. TFA/DCM 3:7, rt, 16 h, quant.



Scheme 2 Reagents and conditions: i: 1. $\text{SOCl}_2/\text{MeOH}$ (89%); 2. $\text{BnBr}/\text{K}_2\text{CO}_3$ (99%); 3. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, THF, H_2O , 50 °C, 12 h, quant.; 4. L-Ser-OMe or D-Ser-OMe, TBTU, Et_3N , DMF, rt, 16 h (84% and 82% respectively); 5. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, THF, H_2O , 50 °C, 16 h, quant.; ii: H_2 , Pd-C, MeOH, rt, 3 h, quant.; iii: N^6 -Cbz-L-ornithine-O t Bu, TBTU, Et_3N , DMF, rt, 16 h, (81% and 93% respectively); iv: 1. H_2 , Pd/C, MeOH, rt, 3 h, quant.; 2. TFA/DCM 3:7, rt, 16 h, quant.; v: 1. $(\text{NHBC})_2\text{NTf}$, Et_3N , CHCl_3 , rt, 1 h (71% and 79% respectively); 2. TFA/DCM 3:7, rt, 16 h, quant.

2,3-dihydroxybenzoyl derivatives linked directly to a serine (instead of arginine residues) using a similar strategy to that described above (analogues **8**, **10** and **11**)

Coupling of the L- and D-serine methyl esters with 2,3-dibenzoyloxybenzoic acid using TBTU, followed by hydrolysis of the corresponding esters with barium hydroxide, afforded compounds **7a** (84% yield) and **7b** (82% yield), respectively. Catalytic hydrogenation of acids **7a** and **7b** gave analogues **8a** (DHBA-L-Ser)¹⁸ and **8b** (DHBA-D-Ser) in quantitative yields.

The N^6 -benzyloxycarbonyl-L- and D-ornithine *tert*-butyl esters¹⁹ were coupled with compound **7a** using TBTU, and the resulting products were submitted to catalytic hydrogenation to give compounds **9a** (81% yield) and **9b** (83% yield), respectively. Acidic hydrolysis of the *tert*-butyl ester afforded analogues **10a** (DHBA-L-Ser-L-Orn) and **10b** (DHBA-L-Ser-D-Orn), both in quantitative yield..

Finally, guanidinylation of **9a** and **9b** as before followed by acidic hydrolysis gave **11a** (DHBA-L-Ser-L-Arg) and **11b** (DHBA-L-Ser-D-Arg) in 71% and 69% yield, respectively.

Biological evaluation

Compounds **1**, **3**, **4**, **6**, **8**, **10** and **11** were evaluated for their siderophore activities by growth promotion assays with several bacteria that are well defined in their ability to transport and utilize natural siderophores (siderophore indicator strains). The following indicator strains were used: *Vibrio anguillarum* serotype O2 RV22 (strain producing vanchrobactin), *V. anguillarum* serotype O1 775 (strain producing siderophore anguibactin, but that can also use vanchrobactin as siderophore), *Vibrio alginolyticus* TA15²⁰ (strain producing a hydroxamate siderophore that cannot use vanchrobactin as an exogenous siderophore), *Erwinia chrysanthemi* PPV20 (strain that produces chrysobactin, a siderophore structurally related to vanchrobactin)²¹ and *Salmonella enterica* enb-1 (a mutant strain that does not produce the natural

siderophore enterobactin but that can use vanchrobactin as an exogenous siderophore).²² The results of these growth promotion assays are given in Table 1.

Growth promotion of *Vibrio anguillarum* strains

All analogues were tested for growth promotion under iron-deficient conditions for two strains of *V. anguillarum*: (a) one strain (RV22 from serotype O2) from which vanchrobactin was isolated, and (b) one strain (775 from serotype O1) that produces the siderophore anguibactin. All analogues stimulated growth of both strains with the exception of **3a** (DHBA-L-Orn), which was inactive. These results are consistent with the catecholate and amino acidic structural nature of the natural siderophores biosynthesized by both strains. Furthermore, they indicate that these microorganisms are not very specific in the use of siderophores and they can use several different ones to supply iron to the cell, even siderophores with very different structures.

The natural siderophore **1c**, along with its stereoisomers **1a** and **1b**, having the sequence DHBA-Arg-Ser, was found to be the most active compound in the growth promotion of *V. anguillarum* RV22 (serotype O2). The similar values obtained for the three analogous stereoisomers **1a–c** indicate that the absolute configuration of the amino acid moieties has little influence on the siderophore activity. Interestingly, compounds **6b** and **6c**, which have an ornithine instead of an arginine residue, also promoted the growth of both strains under iron-deficient conditions. This result could be very useful because these vanchrobactin derivatives possess an amino group that can be attached to other bioactive agents in the Trojan horse strategy. Compounds in which DHBA is linked directly to serine and to D-ornithine were found to be the most active analogues in the growth promotion of *V. anguillarum* 775 (serotype O1). These differences between the two strains could be due to the different outer membrane proteins involved in ferric-siderophore transport in strains RV22 and 775.³

Table 1 Growth promotion is represented as a growth halo diameter (average values after three independent experiments) of the indicator strains as follows: –, no growth; +, halo <12 mm; ++, halo diameter 12–14 mm; +++, halo diameter 15–17 mm; +++++, halo diameter >17 mm. The CAS test gives negative values: higher numbers indicate higher iron chelating activity. The natural compound (1c, vanchrobactin) is shown in *italics*

Analogues	<i>Vibrio anguillarum</i> RV22 (serotype O2)	<i>Vibrio anguillarum</i> 775 (serotype O1)	<i>Erwinia chrysanthemi</i> PPV20	<i>Vibrio alginolyticus</i> TA15	<i>Salmonella enterica</i> enb-1	CAS Test
Series Orn(Arg)-Ser						
Fe ₃ (SO ₄) ₃ (growth control)	+++	+++	+++	+++	++	–
DHBA-L-Arg-D-Ser (1a)	+++	++	+	–	–	–0.655
DHBA-L-Arg-L-Ser (1b)	+++	++	++	–	–	–0.736
<i>DHBA-D-Arg-L-Ser (1c)</i>	++++	++	+++	–	+	–0.714
DHBA-L-Orn (3a)	–	–	–	–	–	–0.353
DHBA-D-Orn (3b)	++	++	+	–	++	–0.672
DHBA-D-Arg (4)	+++	++	++	–	++	–0.476
DHBA-L-Orn-L-Ser (6b)	++	+	++	–	++	–0.621
DHBA-D-Orn-L-Ser (6c)	++	++	++	–	+	–0.679
Series Ser-Orn(Arg)						
DHBA-L-Ser (8a)	++	+++	–	–	–	–0.589
DHBA-D-Ser (8b)	++	+++	–	–	–	–0.788
DHBA-L-Ser-L-Orn (10a)	++	+	+	–	+++	–
DHBA-L-Ser-D-Orn (10b)	++	+	+	–	+++	–
DHBA-L-Ser-L-Arg (11a)	++	+	+	–	++	–0.476
DHBA-L-Ser-D-Arg (11b)	++	+	+	–	+	–0.547

Growth promotion of *Vibrio alginolyticus* TA15

In order to test the specificity of each analogue, all compounds were tested for growth promotion of a strain belonging to the Vibrionaceae family, but producing a different type of siderophore. The lack of biological activity in *V. alginolyticus* TA15 of all analogues probably confirms the presence of a completely different structure for the still unknown natural siderophore synthesized by this pathogen. In fact, a recent study suggested a structure that is closely related to vibrioferrin,²³ which is a non-catecholate siderophore belonging to a member of the carboxylate class of siderophores and contains two α -hydroxy acid groups.²⁴

Growth promotion of *Erwinia chrysanthemi* PPV20

This strain produces chrysobactin, a catechol siderophore bearing lysine and serine residues linked to DHBA.²¹ Thus, the only difference in the structure with respect to vanchrobactin is the substitution of the arginine by a lysine residue. Due to these highly related structures, we tested whether *E. chrysanthemi* could use vanchrobactin and its analogues as siderophores. The synthetic compounds in which the DHBA residue is directly linked to ornithine or arginine were the most active analogues for the growth promotion of *E. chrysanthemi*. However, those analogues in which the DHBA is linked directly to serine showed weaker growth promotion ability or were inactive. This result suggests that the ferric-siderophore receptors present in *E. chrysanthemi* are probably more structure-specific than those present in *V. anguillarum*.

Growth promotion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium enb-1

All salmonellas produce the well-known siderophore enterobactin, which is a cyclic trimer of 2,3-dihydroxy-N-benzoyl-L-serine. Our previous studies³ showed that the enterobactin-deficient mutant enb-1 can use vanchrobactin to overcome iron limitation. We wished to determine whether this utilization is exclusive for the natural siderophore. The results showed that besides vanchrobactin, other derivatives containing ornithine instead of arginine were also active as growth promoters under iron-limiting conditions.

Siderophore activity of vanchrobactin analogues in CAS assays

In parallel to the growth promotion assays, the relative iron complexing capacities of the siderophore derivatives were evaluated by reactivity with chrome azurol-S (CAS),²⁵ and the results are shown in Table 1. Most analogues gave a positive reaction in this test with a range of values from –0.353 for **3a** to –0.788 for **8b**; the exceptions are compounds **10a** and **10b**, which lack reactivity for unknown reasons. It is worth noting that a high CAS reactivity does not necessarily reflect high growth promotion ability. This is explained by the fact that the CAS test is based on the iron chelating activity of each compound, while the growth promotion assays reflect the ability of each strain to actually transport the different compounds into the cell, a process that is related to the recognition of each ferric-compound by an appropriate outer membrane receptor. Thus, there is generally a qualitative match between the two methods but not a quantitative correlation, and high biological activity can be seen along with relatively low CAS

reaction and *vice versa*. This same observation was previously reported for analogues of exochelin from *Mycobacterium*.²⁶

Conclusions

Very few systematic investigations into structure–activity correlations of siderophores have been performed to date on amino acids and dipeptides. We have prepared a new series of analogues of vanchrobactin (**1c**) in order to determine the influence on the iron transport activities of the configuration of the asymmetric centres, the presence of the amino acid residues linked to the dihydroxybenzoic acid moiety, and the presence of the guanidine or amine moiety on the arginine or ornithine residues. The results reveal the lack of stereoisomeric influence of the amino acid scaffold on the siderophore activity in both serotypes of *V. anguillarum*, although some differences can be observed in *Erwinia chrysanthemi* PPV20 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* enb-1.

V. anguillarum and other Gram-negative bacteria tested were able to use several different analogues as siderophores, with the exception of *V. alginolyticus* TA15, which did not use any of them. The siderophore activity found for most of the synthetic analogues in the growth promotion of *Erwinia chrysanthemi* PPV20 is consistent with the catecholate amino acid structure of chrysobactin, its natural siderophore. This finding is in agreement with previous observations concerning the importance of the aromatic ring in catecholate siderophores binding to the outer membrane receptors. In this regard, the *Escherichia coli* FepA receptor transports certain catecholate ferric siderophores but not others, nor any noncatecholate compounds.²⁷

Our observations confirm previous reports in the sense that microorganisms are not always selective in the use of siderophores and they can use several different ones to supply iron to the cell, even siderophores with very different structures. This lack of specificity could be an evolutionary adaptation of bacterial pathogens to increase the number of possibilities to obtain iron from the environment.

A vanchrobactin analogue has been prepared that has siderophore activity and an amino functionality that could be used as an anchor group to attach it to other bioactive agents. This opens new and interesting possibilities for the use of the Trojan horse strategy to develop new drugs that are effective against vibriosis and other related infections. The relatively low specificity of siderophore utilization could enable the design of drugs that are effective against different Gram-negative bacteria. Experiments aimed at this objective are currently under way.

Experimental

N^α-2,3-Dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-L-ornithine (**2a**)

N^δ-Benzyloxycarbonyl-L-ornithine methyl ester hydrochloride (0.19 g, 0.66 mmol) and TBTU (0.32 g, 0.99 mmol) were added to a stirred solution of 2,3-dibenzoyloxybenzoic acid (0.22 g, 0.66 mmol) in anhydrous DMF (6 mL). After 10 min, triethylamine (0.23 mL, 1.65 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h under an atmosphere of argon. T.l.c. (ethyl acetate–hexane 1:1) indicated complete conversion of the

acid starting material (*R*_f 0.0) to a major product (*R*_f 0.32). The solvent was removed *in vacuo* and the residue was preabsorbed onto silica and purified by flash column chromatography (ethyl acetate–hexane 1:2→1:1) to yield *N*^α-2,3-dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-L-ornithine methyl ester (0.31 g) as a clear oil, which was immediately dissolved in THF (10 mL) and water (10 mL). To the resulting solution, barium hydroxide (0.27 g, 1.58 mmol) was added and the mixture was stirred for 16 h at 50 °C, when t.l.c. (ethyl acetate–hexane 1:1) indicated complete conversion of starting material (*R*_f 0.32) to a major product (*R*_f 0.0). DOWEX 50 W (H⁺) was added to the solution to give a pH = 6 and the resin was then removed by filtration. The filtrate was evaporated *in vacuo* to give *N*^α-2,3-dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-L-ornithine (**2a**) (0.29 g, 0.51 mmol, 79%), which was used without further purification.

N^α-2,3-Dibenzoyloxybenzoyl-L-ornithine (**3a**)

N^α-2,3-Dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-L-ornithine (**2a**) (82 mg, 0.12 mmol) was dissolved in methanol (4 mL) and the flask was flushed with argon. 5% Pd/C (0.01 g) was added and the flask was again flushed with argon. The reaction mixture was flushed with hydrogen and stirred under a hydrogen atmosphere for 3 h, after which t.l.c. (dichloromethane–methanol 95:5) indicated complete consumption of the starting material. The reaction mixture was filtered through Celite and the solvent was removed *in vacuo* to afford *N*^α-2,3-dibenzoyloxybenzoyl-L-ornithine (**3a**) (65 mg, 0.15 mmol, quantitative), which was used without further purification; [*a*]_D²⁵: +2.3 (c, 0.8 in H₂O); ¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ_H: 1.73–1.98 (m, 4H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 2.91–2.99 (m, 2H, OrnH-2, OrnH-2'), 4.43–4.45 (m, 1H, OrnH-1), 6.86–7.42 (m, 3H, DHBH-4, DHBH-5, DHBH-6); ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): 25.33, 30.88, 40.44 (OrnC-3, OrnC-4, OrnC-5), 49.88 (OrnC-2), 118.91, 128.79, 128.75 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 129.52, 135.12, 135.14 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 170.32 (CO₂H); (+)-LRESIMS (*m/z*, %): 269.11 ([M + H]⁺, 100%); (+)-HRESIMS: calculated for C₁₂H₁₇N₂O₇ [M + H]⁺ 269.1131, found 269.1129.

N^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-L-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester (**5b**)

L-Serine *tert*-butyl ester (0.09 g, 0.44 mmol) was coupled to 2,3-dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-Cbz-L-ornithinic acid (**2a**) (0.06 g, 0.12 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) and triethylamine (0.15 mL, 1.11 mmol) using TBTU as coupling agent (0.21 g, 0.67 mmol). The solvent was removed *in vacuo* and the residue was preabsorbed onto silica and purified by flash column chromatography (ethyl acetate–hexane 1:2→2:3) to yield *N*^α-2,3-dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-L-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester, which was hydrogenated in methanol (5 mL) using 5% Pd–C (0.01 g) as catalyst. The reaction mixture was filtered through Celite and the solvent was removed *in vacuo* to afford *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-L-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester (**5b**) (54 mg, 0.14 mmol, 28%), which was used without further purification; [*a*]_D²⁵: +15.8 (c, 0.3 in CHCl₃); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ_H: 1.42 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.67–1.91 (m, 4H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 2.94–2.96 (m, 2H, OrnH-5, OrnH-5'), 3.52 (m, 1H, SerH-3), 3.76 (m, 1H, SerH-3'), 4.55–4.67 (m, 2H, OrnH-2, SerH-2), 6.61 (bs, 1H,

-NH-), 7.66–7.91 (m, 3H, DHBH-4, DHBH-5, DHBH-6), 8.22 (bs, 1H, -NH-); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 23.21 (OrnC-4), 27.30, 27.97 (-C(CH₃)₃), 27.97 (OrnC-5), 52.13 (OrnC-3), 53.15, 62.24 (OrnC-2, SerC-2), 73.31 (SerC-3), 82.11 (-C(CH₃)₃), 118.41, 119.00, 119.19 (DHBC-5, DHBC-6, DHBC-7), 145.25, 148.37 (DHBC-2, DHBC-3, DHBC-4), 169.41, 169.80, 171.63 (3 \times C=O); (+)-LRFABMS (m/z , %): 434.2 [M + Na]⁺, 412.2 [M + H]⁺.

N^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-L-ornithinyl-L-serine (6b)

N^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-L-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester (5b) (31 mg, 0.075 mmol) was stirred at room temperature in a solution of TFA and DCM (3:7, 1 mL). After 16 h, evaporation of the solvent under reduced pressure and coevaporation with toluene afforded *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-L-ornithinyl-L-serine (6b) (25 mg, 0.07 mmol, quantitative) as a dark yellow oil; $[a]_{\text{D}}^{26}$: -8.0 (c, 0.11 in H₂O); ^1H NMR (200 MHz, D₂O) δ_{H} : 1.78–2.09 (m, 4H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 3.04–3.09 (m, 2H, OrnH-5, OrnH-5'), 3.90 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3\text{H}_2} = 4.0$ Hz, $J_{\text{H}_3\text{H}_3'} = 11.7$ Hz, SerH-3), 3.99 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3'\text{H}_2} = 5.1$ Hz, $J_{\text{H}_3\text{H}_3''} = 11.7$ Hz, SerH-3'), 4.57–4.60, 4.68–4.70 (2 \times m, 2H, SerH-2, OrnH-2), 6.89 (t, 1H, $J_{\text{H}_4\text{H}_5} = J_{\text{H}_5\text{H}_6} = 8.1$ Hz, DHBH-5), 7.10, 7.30 (2 \times d, 2H, $J_{\text{H}_4\text{H}_5} = J_{\text{H}_5\text{H}_6} = 8.1$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ^{13}C NMR (50 MHz, D₂O) δ_{C} : 23.93 (OrnC-4), 28.85 (OrnC-3), 39.56 (OrnC-5), 53.94, 55.49 (OrnC-2, SerC-2), 61.59 (SerC-3), 120.12, 120.33, 120.44 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 117.44, 145.16, 147.20 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 170.61, 173.66 (2 \times CONH), 174.18 (CO₂H); (+)-LRESIMS (m/z , %): 356.14 ([H]⁺, 100%); (+)-HRESIMS calculated for C₁₅H₂₂N₃O₇ [M + H]⁺ 356.1452, found 356.1457.

2,3-Dihydroxybenzoyl-L-argininyl-L-serine (1b)

To a stirred solution of *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-L-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester (5b) (29 mg, 0.07 mmol) in chloroform (1 mL) was added 1,3-di-*tert*-butoxycarbonyl-2-(trifluoromethanesulfonyl)guanidine (26 mg, 0.065 mmol) and triethylamine (0.01 mL, 0.07 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature. After 1 h, methanol (0.5 mL) was added and the mixture was stirred for a further 30 min. The mixture was then preabsorbed onto silica and purified by flash column chromatography (methanol–DCM 5%) to yield *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-*N*^ω-*tert*-butoxycarbonyl-*N*^ω-*tert*-butoxycarbonyl-L-argininyl-L-serine *tert*-butyl ester, which was then stirred at room temperature in a solution of TFA and DCM (3:7, 1 mL). After 16 h, evaporation of the solvent under reduced pressure and coevaporation with toluene afforded 2,3-dihydroxybenzoyl-L-argininyl-L-serine (1b) (25 mg, 0.06 mmol, 73%) as a dark yellow oil; $[a]_{\text{D}}^{24}$: +12.0 (c, 0.7 in MeOH); ^1H NMR (200 MHz, D₂O) δ_{H} : 1.61–1.95 (m, 4H, ArgH-3, ArgH-3', ArgH-4, ArgH-4'), 3.13–3.17 (m, 2H, ArgH-5, ArgH-5'), 3.78–3.97 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 4.43–4.59 (m, 2H, SerH-2, ArgH-2), 6.77 (t, 1H, $J_{\text{H}_4\text{H}_5} = J_{\text{H}_5\text{H}_6} = 8.1$ Hz, DHBH-5), 6.99, 7.21 (2 \times d, 2H, $J_{\text{H}_4\text{H}_5} = J_{\text{H}_5\text{H}_6} = 8.1$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ^{13}C NMR (50 MHz, D₂O) δ_{C} : 24.92 (ArgC-4), 29.10 (ArgC-3), 41.16 (ArgC-5), 54.04, 55.44 (ArgC-2, SerC-2), 61.63 (SerC-3), 117.35, 120.16, 120.41 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 145.18, 147.25 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 157.30 (C=N), 170.39, 173.70 (2 \times CONH), 174.39 (CO₂H); (+)-LRESIMS (m/z , %): 398.10 ([M + H]⁺, 84%);

(+)-HRESIMS: calculated for C₁₆H₂₄N₃O₉ [M + H]⁺ 398.1670, found 398.1674.

N^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-L-ornithinyl-D-serine *tert*-butyl ester (5a)

D-Serine *tert*-butyl ester (0.10 g, 0.53 mmol) was coupled with *N*^α-2,3-dibenzyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-L-ornithine (2a) in a similar way as D-serine *tert*-butyl ester to yield *N*^α-2,3-dibenzyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-L-ornithinyl-D-serine *tert*-butyl ester (0.11 g), which was hydrogenated in a similar way as the corresponding L-ornithinyl-L-serine derivative to afford *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-L-ornithinyl-D-serine *tert*-butyl ester (5a) (57 mg, 0.14 mmol, 29%), which was used without further purification; $[a]_{\text{D}}^{24}$: -12.0 (c, 1.5 in H₂O); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 1.40 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.49–2.47 (m, 6H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4', OrnH-5, OrnH-5'), 3.40–3.71 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 4.45–4.53 (m, 2H, SerH-2, ArgH-2), 6.28–6.34 (m, 1H, DHBH-5), 6.71–7.27 (m, 2H, DHBH-4, DHBH-6); (+)-LRFABMS (m/z , %): 434.2 [M + Na]⁺, 412.2 [M + H]⁺.

2,3-Dihydroxybenzoyl-L-argininyl-D-serine (1a)

N^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-L-ornithinyl-D-serine *tert*-butyl ester (5a) (57 mg, 0.15 mmol) was reacted with 1,3-di-*tert*-butoxycarbonyl-2-(trifluoromethanesulfonyl)guanidine (52 mg, 0.13 mmol) in a similar way as 5b to yield *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-*N*^ω-*tert*-butoxycarbonyl-*N*^ω-*tert*-butoxycarbonyl-L-argininyl-D-serine *tert*-butyl ester (60 mg) which was hydrolysed in a similar way as the L-argininyl-L-serine derivative to afford 2,3-dihydroxybenzoyl-L-argininyl-D-serine (1a) (27 mg, 0.06 mmol, 62%) as a dark yellow oil; $[a]_{\text{D}}^{24}$: -16.4 (c, 0.7 in MeOH); ^1H NMR (200 MHz, D₂O) δ_{H} : 1.56–1.94 (m, 4H, ArgH-3, ArgH-3', ArgH-4, ArgH-4'), 3.10–3.14 (m, 2H, ArgH-5, ArgH-5'), 3.80 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3\text{H}_2} = 3.9$ Hz, $J_{\text{H}_3\text{H}_3'} = 10.1$ Hz, SerH-3), 3.80 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3'\text{H}_2} = 5.1$ Hz, $J_{\text{H}_3\text{H}_3''} = 10.1$ Hz, SerH-3'), 4.47–4.57 (m, 2H, SerH-2, ArgH-2), 6.74 (t, 1H, $J_{\text{H}_4\text{H}_5} = J_{\text{H}_5\text{H}_6} = 8.1$ Hz, DHBH-5), 6.96, 7.17 (2 \times d, 2H, $J_{\text{H}_4\text{H}_5} = J_{\text{H}_5\text{H}_6} = 8.1$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ^{13}C NMR (50 MHz, D₂O) δ_{C} : 24.98 (ArgC-4), 29.02 (ArgC-3), 41.13 (ArgC-5), 54.13, 55.48 (ArgC-2, SerC-2), 61.60 (SerC-3), 120.17, 120.32, 120.46 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 117.41, 145.19, 147.17 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 157.32 (C=N), 170.51, 173.72 (2 \times CONH), 174.42 (CO₂H); (+)-LRESIMS (m/z , %): 398.10 ([M + H]⁺, 84%); (+)-HRESIMS: calculated for C₁₆H₂₄N₃O₉ [M + H]⁺ 398.1670, found 398.1674.

N^α-2,3-Dibenzyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-D-ornithine (2b)

N^δ-Benzyloxycarbonyl-D-ornithine methyl ester (0.40 g, 1.39 mmol) was coupled with 2,3-dibenzyloxybenzoic acid in a similar way as the corresponding L-ornithine derivative to yield *N*^α-2,3-dibenzyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-D-ornithine methyl ester (0.65 g), which was hydrolysed in a similar way as the corresponding L-ornithine derivative to give *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-D-ornithine (2b) (0.60 g, 1.06 mmol, 79%), which was used without further purification.

***N*^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-D-ornithine (3b)**

N^α-2,3-Dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-D-ornithine (**2b**) (80 mg, 0.11 mmol) was hydrogenated in a similar way as **2a** to afford *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-D-ornithine (**3b**) (65 mg, 0.11 mmol, quantitative), which was used without further purification; $[α]_D^{23}$: −4.6 (c, 0.55 in D₂O); ¹H NMR (200 MHz, D₂O) $δ_H$: 1.73–1.98 (m, 4H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 2.91–2.99 (m, 2H, OrnH-2, OrnH-2'), 4.43–4.45 (m, 1H, OrnH-1), 6.86–7.42 (m, 3H, DHBH-4, DHBH-5, DHBH-6); ¹³C NMR (50 MHz, D₂O) $δ_C$: 25.33, 30.88, 40.44 (OrnC-3, OrnC-4, OrnC-5), 49.88 (OrnC-2), 118.91, 128.79, 128.75 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 129.52, 135.12, 135.14 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 170.32 (CO₂H); (+)-LRESIMS (*m/z*, %): 269.11 ([M + H]⁺, 100%); (+)-HRESIMS: calculated for C₁₂H₁₇N₂O₇ [M + H]⁺ 269.1131, found 269.1129.

2,3-Dihydroxybenzoyl-D-arginine (4)

N^α-2,3-Dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-D-ornithine (**2b**) (0.39 g, 0.69 mmol) was suspended in *tert*-butyl acetate (2.30 mL, 16.70 mmol) and perchloric acid (70%, 0.07 mL, 0.77 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 16 h and added to saturated aqueous sodium bicarbonate (10 mL). After stirring for a further 30 min, the mixture was extracted with diethyl ether (3 × 20 mL) and the combined organic layers were dried, filtered and evaporated *in vacuo* to obtain *N*^α-2,3-dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-D-ornithine *tert*-butyl ester (0.44 g, 48%) as a clear oil, which was hydrogenated using 5% Pd-C (0.07 g) in a similar way as **2a** to afford *N*^α-2,3-dibenzoyloxybenzoyl-D-ornithine *tert*-butyl ester, which was used immediately in the next reaction. This D-ornithine derivative ester was treated with 1,3-di-*tert*-butoxycarbonyl-2-trifluoromethanesulfonyl guanidine (0.12 g, 0.30 mmol) in a similar way as **5b**. The product mixture was then preabsorbed onto silica and purified by flash column chromatography (methanol/DCM 5%), to yield *N*^α-2,3-dibenzoyloxybenzoyl-*N*^α-*tert*-butoxycarbonyl-*N*^ω-*tert*-butoxycarbonyl-D-arginine *tert*-butyl ester (0.133 g), which was then stirred at room temperature in a solution in TFA and DCM (3:7, 1 mL). After 16 h the solvent was evaporated under reduced pressure and coevaporation with toluene afforded 2,3-dihydroxybenzoyl-D-arginine (**4**) (74 mg, 0.25 mmol, 73%) as a dark yellow oil; $[α]_D^{24}$: +3.5 (c, 2.3 in H₂O); ¹H NMR (200 MHz, D₂O) $δ_H$: 1.50–1.60, 1.68–1.94 (2 × m, 4H, ArgH-3, ArgH-3', ArgH-4, ArgH-4'), 3.03–3.07 (m, 2H, ArgH-5, ArgH-5'), 4.43–4.59 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 5.4$ Hz, $J_{H2,H3'} = 8.7$ Hz, ArgH-2), 6.67 (t, 1H, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 8.1$ Hz, DHBH-5), 6.90, 7.12 (2 × d, 2H, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 8.1$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ¹³C NMR (50 MHz, D₂O) $δ_C$: 24.54 (ArgC-4), 27.83 (ArgC-3), 40.58 (ArgC-5), 52.60 (ArgC-2), 116.15, 119.30, 119.71 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 144.67, 147.15 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 156.74 (C=N), 170.00, 1756.29 (2 × CONH), 174.39 (CO₂H); (+)-LRESIMS (*m/z*, %): 311.13 ([M + H]⁺, 81%); (+)-HRESIMS: calculated for C₁₃H₁₈N₄O₅ [M + H]⁺ 311.1354, found 311.1349.

***N*^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-D-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester (5c)**

N^α-2,3-Dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-D-ornithine methyl ester (**2b**) (0.51 g, 0.90 mmol) was coupled with L-serine

in a similar way as **2a** to yield *N*^α-2,3-dibenzoyloxybenzoyl-*N*^δ-benzyloxycarbonyl-D-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester, which was hydrogenated as previously reported for the L-ornithinyl-L-serine derivative to afford *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-D-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester (**5c**) (0.33 g, 0.83 mmol, 82%), which was used without further purification; $[α]_D^{23}$: +14.6 (c, 0.14 in Cl₃CH); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) $δ_H$: 1.40 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.49–2.47 (m, 6H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4', OrnH-5, OrnH-5'), 3.40–3.71 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 4.45–4.53 (m, 2H, SerH-2, ArgH-2), 6.28–6.34 (m, 1H, DHBH-5), 6.71–7.27 (m, 2H, DHBH-4, DHBH-6); (+)-LRFABMS (*m/z*, %): 434.2 [M + Na]⁺, 412.2 [M + H]⁺.

***N*^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-D-ornithinyl-L-serine (6c)**

N^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-D-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester (**5c**) (45 mg, 0.11 mmol) was hydrolysed in a similar way as **5a** to afford *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-D-ornithinyl-L-serine (**6c**) (36 mg, 0.11 mmol, quantitative) as a dark yellow oil; $[α]_D^{22}$: +8.7 (c, 0.16 in H₂O); ¹H NMR (200 MHz, D₂O) $δ_H$: 1.71–2.04 (m, 4H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 3.00–3.05 (m, 2H, OrnH-5, OrnH-5'), 3.86 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 4.1$ Hz, $J_{H3,H3'} = 12.0$ Hz, SerH-3), 3.95 (dd, 1H, $J_{H3',H2} = 5.0$ Hz, $J_{H3,H3'} = 12.0$ Hz, SerH-3'), 4.53–4.56, 4.62–4.65 (2 × m, 2H, SH-2, OrnH-2), 6.81 (t, 1H, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 8.0$ Hz, DHBH-5), 7.03, 7.23 (2 × d, 2H, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 8.0$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ¹³C NMR (50 MHz, D₂O) $δ_C$: 23.92 (OrnC-4), 28.85 (OrnC-3), 39.53 (OrnC-5), 53.94, 55.97 (OrnC-2, SerC-2), 61.78 (SerC-3), 120.22, 120.35, 120.52 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 117.45, 145.20, 147.07 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 170.63, 174.06 (2 × CONH), 174.26 (CO₂H); (+)-LRESIMS (*m/z*, %): 356.14 ([M + H]⁺, 100%); (+)-HRESIMS calculated for C₁₅H₂₂N₃O₇ [M + H]⁺ 356.1452, found 356.1458.

2,3-Dihydroxybenzoyl-D-argininyl-L-serine (1c)

N^α-2,3-Dihydroxybenzoyl-D-ornithinyl-L-serine *tert*-butyl ester (**5c**) (95 mg, 0.25 mmol) reacted with 1,3-di-*tert*-butoxycarbonyl-2-trifluoromethanesulfonylguanidine (85 mg, 0.21 mmol) in a similar way as **5a** to yield *N*^α-2,3-dihydroxybenzoyl-*N*^α-*tert*-butoxycarbonyl-*N*^ω-*tert*-butoxycarbonyl-D-argininyl-L-serine *tert*-butyl ester, which was hydrolysed in a similar way as the corresponding L-argininyl-L-serine derivative to afford 2,3-dihydroxybenzoyl-D-argininyl-L-serine (**1c**) (69 mg, 0.16 mmol, 61%) as a dark yellow oil; $[α]_D^{24}$: −20.8 (c, 0.1 in H₂O) [natural sample: $[α]_D^{24}$: −15.9 (c, 0.08 in H₂O)]; ¹H NMR (500 MHz, D₂O) $δ_H$: 1.56–1.94 (m, 4H, ArgH-3, ArgH-3', ArgH-4, ArgH-4'), 3.10–3.14 (m, 2H, ArgH-5, ArgH-5'), 3.80 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 3.9$ Hz, $J_{H3,H3'} = 10.1$ Hz, SerH-3), 3.90 (dd, 1H, $J_{H3',H2} = 5.1$ Hz, $J_{H3,H3'} = 10.1$ Hz, SerH-3'), 4.47–4.57 (m, 2H, SerH-2, ArgH-2), 6.74 (t, 1H, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 8.1$ Hz, DHBH-5), 6.96, 7.17 (2 × dd, 2H, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.1$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ¹³C NMR (120 MHz, D₂O) $δ_C$: 24.98 (ArgC-4), 29.02 (ArgC-3), 41.13 (ArgC-5), 54.13, 55.48 (ArgC-2, SerC-2), 61.60 (SerC-3), 120.17, 120.32, 120.46 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 117.41, 145.19, 147.17 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 157.32 (C=N), 170.51, 173.72 (2 × CONH), 174.42 (CO₂H); (+)-LRESIMS (*m/z*, %): 398.10 ([M + H]⁺, 84%); (+)-HRESIMS: calculated for C₁₆H₂₄N₃O₉ [M + H]⁺ 398.1670, found 398.1674.

2,3-Dibenzyloxybenzoyl-L-serine (7a)

L-Serine hydrochloride methyl ester (0.34 g, 2.16 mmol) was coupled to 2,3-dibenzyloxybenzoic acid (0.72 g, 2.16 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) and triethylamine (0.75 mL, 5.39 mmol) using TBTU as the coupling agent (1.04 g, 3.23 mmol). The solvent was removed *in vacuo* and the residue was preabsorbed onto silica and purified by flash column chromatography (ethyl acetate–hexane 1:1) to yield 2,3-dibenzyloxybenzoyl-L-serine methyl ester, which was then dissolved in THF (40 mL) and water (80 mL). To the resulting solution, barium hydroxide (0.79 g, 4.58 mmol) was added and the mixture was stirred for 3 h at 50 °C, after which t.l.c. (ethyl acetate–cyclohexane 2:3) indicated complete conversion of starting material (R_f 0.28) to a major product (R_f 0.0). DOWEX 50 W (H^+) was added to the solution to give a pH = 6, the resin was removed by filtration and the filtrate was evaporated *in vacuo* to give 2,3-dibenzyloxybenzoyl-L-serine (**7a**) (0.84 g, 2.00 mmol, 84%), which was used for the next step without further purification.

2,3-Dihydroxybenzoyl-L-serine (8a)

2,3-Dibenzyloxybenzoyl-L-serine (**7a**) (0.04 g, 0.10 mmol) was hydrogenated using 5% Pd/C (1 mg) in a similar way as **2b** to afford 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine (**8a**) (23 mg, 0.1 mmol, quantitative); $[\alpha]_D^{25}$: +12.2 (c, 0.6 in H_2O); 1H NMR (200 MHz, D_2O) δ_H : 4.39 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 5.04 (m, 1H, SerH-2), 7.14 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, DHBH-5), 7.35, 7.73 (2 \times d, 2H, $J = 7.0$ Hz, $J = 7.2$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ^{13}C NMR (200 MHz, D_2O) δ_C : 49.53 (SerC-2), 62.18 (SerC-3), 116.96, 120.02, 120.24 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 145.12, 147.54 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 170.21 (CONH), 177.64 (CO_2OH); (+)-LRESIMS (m/z , %): 264.05 [$M + Na$] $^+$, 242.06 [$M + H$] $^+$; (+)-HRESIMS: calculated for $C_{10}H_{12}NO_6$ [$M + H$] $^+$ 242.0659; found 242.0659.

2,3-Dihydroxybenzoyl-L-serinyl-L-ornithine tert-butyl ester (9a)

N^6 -Benzyloxycarbonyl-L-ornithine tert-butyl ester (0.07 g, 0.21 mmol) was coupled to 2,3-dibenzyloxybenzoyl-L-serine (**7a**) (0.06 g, 0.12 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) and triethylamine (0.07 mL, 0.52 mmol) using TBTU as coupling agent (0.10 g, 0.30 mmol). The solvent was removed *in vacuo* and the residue was preabsorbed onto silica and purified by flash column chromatography (ethyl acetate–hexane 2:1) to yield 2,3-dibenzyloxybenzoyl-L-serinyl- N^6 -benzyloxycarbonyl-L-ornithine tert-butyl ester, which was hydrogenated in methanol (6 mL) using 5% Pd/C (0.02 g) as catalyst. The reaction mixture was filtered through Celite and the solvent was removed *in vacuo* to afford 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serinyl-L-ornithine tert-butyl ester (**9a**) (64 mg, 0.16 mmol, 81%), which was used without further purification; $[\alpha]_D^{25}$: +15.5 (c, 0.55 in MeOH); 1H NMR (200 MHz, CD_3OD) δ_H : 1.40 (s, 9H, $-C(CH_3)_3$), 1.51–1.86 (m, 4H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 2.78 (m, 2H, OrnH-5, OrnH-5'), 3.89–3.90 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 4.35 (m, 1H, SerH-2), 4.66 (bs, 1H, ArgH-2), 6.30–6.38 (m, 1H, DHBH-5), 6.76, 7.28 (2 \times d, 2H, $J = 7.0$ Hz, $J = 7.3$ Hz, DHBH-4, DHBH-6), (+)-LRFABMS (m/z , %): 434.2 [$M + Na$] $^+$, 412.2 [$M + H$] $^+$.

2,3-Dihydroxybenzoyl-L-serinyl-L-ornithine (10a)

2,3-Dihydroxybenzoyl-L-serinyl-L-ornithine tert-butyl ester (**9a**) (51 mg, 0.012 mmol) was stirred at room temperature in a solution of TFA and DCM (3:7, 1 mL). After 16 h, evaporation of the solvent under reduced pressure and coevaporation with toluene afforded 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serinyl-L-ornithine (**10a**) (44 mg, 0.12 mmol, quantitative) as a clear oil; $[\alpha]_D^{25}$: +3.9 (c, 1.1 in MeOH); 1H NMR (200 MHz, D_2O) δ_H : 1.32–1.87 (m, 4H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 2.85–2.99 (m, 2H, OrnH-5, OrnH-5'), 3.86–3.94 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 4.51–4.61 (m, 2H, SerH-2, OrnH-2), 6.64 (t, 1H, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 7.8$ Hz, DHBH-5), 7.04, 7.21 (2 \times d, 2H, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 7.8$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O) δ_C : 23.87 (OrnC-4), 29.17 (OrnC-3), 39.67 (OrnC-5), 49.51, 56.28 (OrnC-2, SerC-2), 62.04 (SerC-3), 117.73, 118.59, 120.52 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 145.66, 147.01 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 169.89, 171.44 (2 \times CONH), 173.57 (CO_2H).

2,3-Dihydroxybenzoyl-L-serinyl-L-arginine (11a)

2,3-Dihydroxybenzoyl-L-serinyl-L-ornithine tert-butyl ester (**9a**) (64 mg, 0.15 mmol) was treated with 1,3-di-*tert*-butoxycarbonyl-2-trifluoromethanesulfonylguanidine (52 mg, 0.13 mmol) in a similar way as **5b**. The product mixture was then preadsorbed onto silica and purified by flash column chromatography (methanol/DCM 5%), to yield N^6 -2,3-dihydroxybenzoyl-L-serinyl- N^{ω} -*tert*-butoxycarbonyl- N^{ω} -*tert*-butoxycarbonyl-L-arginine tert-butyl ester, which was hydrolysed with TFA as before to afford 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serinyl-L-arginine (**11a**) (40 mg, 0.10 mmol, 71%) as a dark yellow oil; $[\alpha]_D^{25}$: +3.2 (c, 0.8 in MeOH); 1H NMR (200 MHz, D_2O) δ_H : 1.60–1.98 (m, 4H, ArgH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 3.12–3.18 (m, 2H, ArgH-5, ArgH-5'), 3.78–3.84 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 4.35 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 4.8$ Hz, $J_{H2,H3'} = 9.0$ Hz, SerH-2), 4.69–4.75 (m, 1H, ArgH-2), 6.74 (t, 1H, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 7.8$ Hz, DHBH-5), 6.96, 7.18 (2 \times d, 2H, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 7.8$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 24.75 (ArgC-4), 27.83 (ArgC-3), 40.25 (ArgC-5), 52.12, 55.43 (ArgC-2, SerC-2), 61.14 (SerC-3), 117.94, 119.06 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 143.88, 146.75 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 156.33 ($C=N$), 170.12, 171.35 (2 \times CONH), 174.03 (CO_2H); (+)-LRESIMS (m/z , %): 398.10 [$M + H$] $^+$, 84%; (+)-HRESIMS: calculated for $C_{16}H_{24}N_5O_9$ [$M + H$] $^+$ 398.1670, found 398.1678.

2,3-Dibenzyloxybenzoyl-D-serine (7b)

D-Serine methyl ester hydrochloride (0.34 g, 2.16 mmol) was coupled with 2,3-dibenzyloxybenzoic acid (0.72 g, 2.16 mmol) in a similar way as L-serine methyl ester to yield 2,3-dibenzyloxybenzoyl-D-serine methyl ester, which was hydrolysed in a similar way as the corresponding L-serine derivative to give 2,3-dibenzyloxybenzoyl-D-serine (**7b**) (0.83 g, 1.97 mmol, 84%), which was used in the next step without further purification.

2,3-Dihydroxybenzoyl-D-serine (8b)

2,3-Dibenzyloxybenzoyl-D-serine (**7b**) (31 mg, 0.07 mmol) was hydrogenated in a similar way as **7a** to afford 2,3-dihydroxybenzoyl-D-serine (**8b**) (17 mg, 0.07 mmol, quantitative); $[\alpha]_D^{25}$: –10.8 (c,

0.8 in H₂O); ¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ_{H} : 4.39 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 5.04 (m, 1H, SerH-2), 7.14 (t, 1H, J 7.0 Hz, DHBH-5), 7.35, 7.73 (2 \times d, 2H, J = 7.0 Hz, J = 7.2 Hz, DHBH-4, DHBH-6); ¹³C NMR (50 MHz, D₂O) δ_{C} : 49.53 (SerC-2), 62.18 (SerC-3), 116.96, 120.02, 120.24 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 145.12, 147.54 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 170.21 (CONH), 177.64 (CO₂OH); (+)-LRESIMS (m/z , %): 264.05 [M + Na]⁺, 242.06 [M + H]⁺; (+)-HRESIMS: calculated for C₁₀H₁₂NO₆ [M + H]⁺ 242.0659; found 242.0659.

2,3-Dihydroxybenzoyl-D-serinyl-L-ornithine *tert*-butyl ester (9b)

2,3-Dibenzyloxybenzoyl-D-serinic acid (**7b**) was coupled with *N*⁶-benzyloxycarbonyl-L-ornithine *tert*-butyl ester (0.07 g, 0.21 mmol) in a similar way as **7a** to yield 2,3-dibenzyloxybenzoyl-D-serinyl-*N*⁶-benzyloxycarbonyl-L-ornithine *tert*-butyl ester, which was hydrogenated in a similar way as the corresponding D-serinyl-L-ornithine derivative to afford 2,3-dihydroxybenzoyl-D-serinyl-L-ornithine *tert*-butyl ester (**9b**) (64 mg, 0.15 mmol, 81%), which was used without further purification; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$: +15.5 (*c*, 0.55 in MeOH); ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 1.40 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.51–1.86 (m, 4H, OrnH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 2.78 (m, 2H, OrnH-5, OrnH-5'), 3.89–3.90 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 4.35 (m, 1H, SerH-2), 4.66 (bs, 1H, ArgH-2), 6.30–6.38 (m, 1H, DHBH-5), 6.76, 7.28 (2 \times d, 2H, J = 7.0 Hz, J = 7.3 Hz, DHBH-4, DHBH-6); (+)-LRESIMS: 434.2 [M + Na]⁺, 412.2 [M + H]⁺.

2,3-Dihydroxybenzoyl-D-serinyl-L-ornithine (10b)

2,3-Dihydroxybenzoyl-D-serinyl-L-ornithine *tert*-butyl ester (**9b**) (45 mg, 0.01 mmol) was hydrolysed in a similar way as **9a** to give 2,3-dihydroxybenzoyl-D-serinyl-L-ornithine (**10b**) (39 mg, 0.01 mmol, quantitative) as a clear oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: -3.1 (*c*, 1.8 in MeOH); ¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ_{H} : 1.32–1.87 (m, 4H, ArgH-3, OrnH-3', OrnH-4, OrnH-4'), 2.85–2.99 (m, 2H, ArgH-5, ArgH-5'), 3.86–3.94 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 4.51–4.61 (m, 2H, SerH-2, ArgH-2), 6.64 (t, 1H, $J_{\text{D4,D5}} = J_{\text{D5,D6}} = 7.8$ Hz, DHBH-5), 7.04, 7.21 (2 \times d, 2H, $J_{\text{D4,D5}} = J_{\text{D5,D6}} = 7.8$ Hz, DHBH-4, DHBH-6); ¹³C NMR (50 MHz, D₂O) δ_{C} : 23.87 (OrnC-4), 29.17 (OrnC-3), 39.67 (OrnC-5), 49.51, 56.28 (OrnC-2, SerC-2), 62.04 (SerC-3), 117.73, 118.59, 120.52 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 145.66, 147.01 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 169.89, 171.44 (2 \times CONH), 173.57 (CO₂H).

2,3-Dihydroxybenzoyl-D-serinyl-L-arginine (11b)

2,3-Dihydroxybenzoyl-D-serinyl-L-ornithine *tert*-butyl ester (**9b**) (64 mg, 0.15 mmol) was reacted with 1,3-di-*tert*-butoxycarbonyl-2-(trifluoromethanesulfonyl)guanidine in a similar way as **9a** to yield *N*⁶-2,3-dihydroxybenzoyl-D-serinyl-*N*⁶-*tert*-butoxycarbonyl-*N*^ω-*tert*-butoxycarbonyl-L-arginine *tert*-butyl ester, which was hydrolysed in a similar way as the corresponding L-serinyl-L-arginine derivative to give 2,3-dihydroxybenzoyl-D-serinyl-L-arginine (**11b**) (42 mg, 0.10 mmol, 71%) as a dark yellow oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: -6.2 (*c*, 0.4 in MeOH); ¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ_{H} : 1.50–1.99 (m, 4H, ArgH-3, ArgH-3', ArgH-4, ArgH-4'), 3.04–3.08 (m, 2H, ArgH-5, ArgH-5'), 3.89–3.91 (m, 2H, SerH-3, SerH-3'), 4.37 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H3}} = 4.8$ Hz, $J_{\text{H2,H3'}} = 9.0$ Hz, SerH-2), 4.69–4.71 (t, 1H, $J_{\text{H2,H3}} = J_{\text{H2,H3'}} = 5.2$ Hz, ArgH-2), 6.74 (t, 1H, $J_{\text{H4,H5}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.8$ Hz, DHBH-5), 6.96, 7.19 (2 \times d, 2H, $J_{\text{H4,H5}} = J_{\text{H5,H6}} =$

7.8 Hz, DHBH-4, DHBH-6); ¹³C NMR (50 MHz, D₂O) δ_{C} : 24.26 (ArgC-4), 27.69 (ArgC-3), 40.36 (ArgC-5), 52.20, 55.62 (ArgC-2, SerC-2), 61.02 (SerC-3), 118.02, 119.66 (DHBC-4, DHBC-5, DHBC-6), 144.46, 146.75 (DHBC-1, DHBC-2, DHBC-3), 156.55 (C=N), 169.85, 171.84 (2 \times CONH), 174.78 (CO₂H); (+)-LRESIMS (m/z , %): 398.10 ([M + H]⁺, 84%); (+)-HRESIMS: calculated for C₁₆H₂₄N₅O₉ [M + H]⁺ 398.1670, found 398.1676.

Biological assays

The growth promotion assays were performed using the disc diffusion method in Petri dishes. All tests were carried out using CM9 minimal medium containing the non-assimilable iron chelator 2,2'-dipyridyl at the appropriate concentration for each test strain to make the medium iron depleted and to hinder normal bacterial growth. Strains to be tested were suspended in this medium before plate pouring. After agar solidification, 10 μ L of siderophore solutions (all adjusted to a concentration of 1 mg mL⁻¹) were applied to sterile paper discs of 6 mm diameter onto the surface of the agar plates. The presence of growth zones around discs after 24 h or 48 h incubation at 25 °C or 37 °C (for *Salmonella enterica*) indicates utilization of the compound as an iron source. Measurement of the growth halo diameter was used as a quantitative estimation of utilization of each derivative. All assays were repeated at least three times and the average values are given in the results. A disc with 10 μ L of a 10 μ M solution of Fe₂(SO₄)₃ was used as the growth control.

In addition, the iron complexation capacity of each compound was tested by the chrome azurol S (CAS) liquid assay developed by Schwyn and Neilands. An aqueous solution of each compound at a concentration of 1 mg mL⁻¹ was diluted to 1:10 in purified water and mixed with 1 vol of the CAS mixture. After 20 min the colour change was measured in a UV-VIS spectrophotometer at 630 nm. A positive siderophore activity produces a colour change from blue to orange with the corresponding reduction in absorbance values with respect to the blank.

Acknowledgements

This work was financially supported by Xunta de Galicia (PGIDIT05RMA10302PR, PGIDIT06PXIC103118PN and PGIDIT04RMA261014PR) and Ministry of Education (MEC) of Spain (cofunded by FEDER) (CQT2005-00793 and AGL2006-00697). R.G.S. thanks the Parga Pondal Programme. M.B. is the recipient of a FPI predoctoral fellowship from the MEC.

References

- (a) C. Ratledge and L. Dover G., *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, **54**, 881–941; (b) C. Wandersman and P. Delepelaire, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2004, **58**, 611–647.
- M. Balado, C. R. Osorio and M. L. Lemos, *Microbiology*, 2006, **152**, 3517–3528.
- R. F. Conchas, M. L. Lemos, J. L. Barja and A. E. Toranzo, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**, 2956–2962.
- M. K. Wolf and J. L. Crosa, *J. Gen. Microbiol.*, 1986, **132**, 2949–2952.
- R. G. Soengas, C. Anta, A. Espada, V. Paz, I. R. Ares, M. Balado, J. Rodríguez, M. L. Lemos and C. Jiménez, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 7113–7116.

- 6 R. G. Soengas, C. Anta, A. Espada, R. M. Nieto, M. Larrosa, J. Rodríguez and C. Jiménez, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 3021–3024.
- 7 (a) M. J. Miller and F. Malouin, *Accts. Chem. Res.*, 1993, **26**, 241–249; (b) A. Ghosh, M. Ghosh, C. Niu, F. Malouin, U. Moellmann and M. J. Miller, *Chem. Biol.*, 1996, **31**, 1011–1019; (c) H. Budzikiewicz, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2001, **1**, 73–82; (d) F. Rivault, C. Liebert, A. Burger, F. Hoegy, M. A. Abdallah, I. J. Schalk and G. L. Mislin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 640–644.
- 8 C. Hennard, Q. C. Truong, J. F. Desnottes, J. M. Paris, N. J. Moreau and M. A. Abdallah, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 2139–2151.
- 9 J. D. Buynak, *Curr. Med. Chem.*, 2004, **11**, 1951–1964.
- 10 C. Lu, J. S. Buyer, J. F. Okonya and M. J. Miller, *BioMetals*, 1996, **9**, 377–283.
- 11 (a) M. Schnabelrauch, S. Wittmann, K. Rahn, U. Möllmann, R. Reissbrodt and L. Heinisch, *BioMetals*, 2000, **13**, 333–348; (b) S. Wittmann, L. Heinisch, I. Scherlitz-Hofmann, T. Stoiber, D. Ankel-Fuchs and U. Möllmann, *BioMetals*, 2004, **17**, 53–64.
- 12 (a) A. J. Walz, U. Möllmann and M. J. Miller, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 1621–1628; (b) R. Schobert Rainer, A. Stangl and K. Hannemann, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 1711–1720.
- 13 E. Masiukiewicz, B. Rzeszotarska and J. Szczurbaniewicz, *Org. Prep. Proc. Int.*, 1992, **24**, 191–194.
- 14 S. K. Sharma, M. J. Miller and S. M. Payne, *J. Med. Chem.*, 1989, **32**, 357–367.
- 15 W. H. Rastetter, T. J. Erickson and M. C. Venuti, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 3579–3590.
- 16 T. T. Charvat, D. J. Lee, W. E. Robinson and A. R. Chamberlin, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 4552–4567.
- 17 K. Feichtinger, H. L. Sings, T. J. Baker, K. Matthews and M. Goodman, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 8432–8439.
- 18 I. G. O'Brien, G. B. Cox and F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, **177**, 321–328.
- 19 M. J. Milewska and A. Chimiak, *Synthesis*, 1990, **3**, 233–234.
- 20 J. Gómez-León, L. Villamil, M. L. Lemos, B. Novoa and A. Figueras, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 98–104.
- 21 M. Persmark, D. Expert and J. B. Neilands, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 3187–3193.
- 22 J. R. Pollack, B. N. Ames and J. B. Neilands, *J. Bacteriol.*, 1970, **104**, 635–639.
- 23 Q. Wang, Q. Liu, Y. Ma, L. Zhou and Y. Zhang, *Arch. Microbiol.*, 2007, **188**, 433–439.
- 24 S. A. Amin, F. C. Küpper, D. H. Green, W. R. Harris and C. J. Carrano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 478–479.
- 25 B. Schwyn and J. B. Neilands, *Anal. Biochem.*, 1987, **160**, 47–56.
- 26 L. Dong, M. J. Miller and U. Möllmann, *BioMetals*, 2004, **17**, 99–104.
- 27 R. Annamalai, B. Jin, Z. Cao, S. M. Newton and P. E. Klebba, *J. Bacteriol.*, 2004, **186**, 3578–3589.